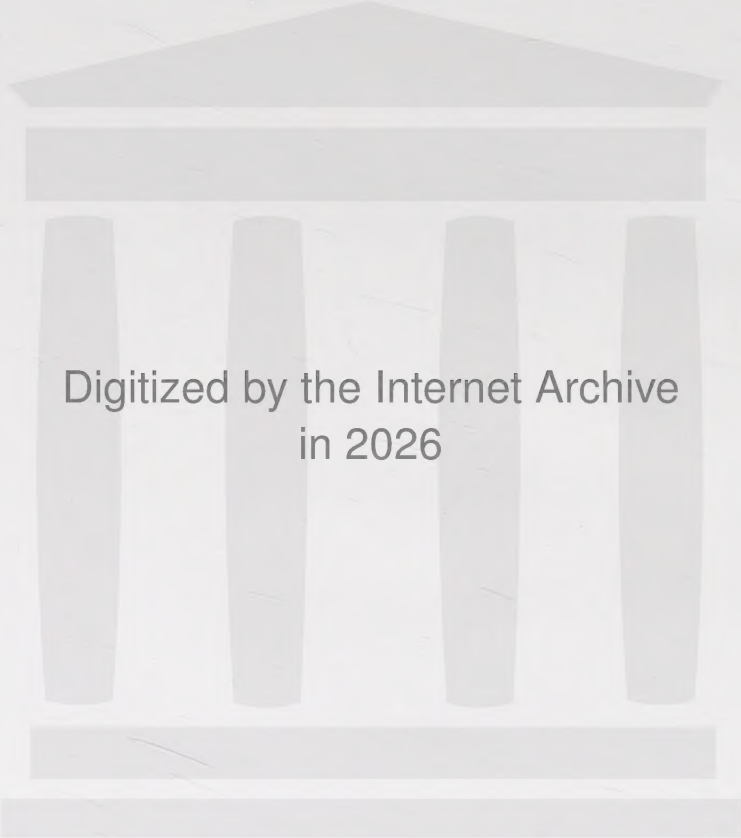


**ISOENZYMATISCHE UNTERSUCHUNGEN DER
LAKTATDEHYDROGENASEN
VERSCHIEDENER HAUTTUMOREN MITTELS
POLYACRYLAMID-DISK-ELEKTROPHORESE**

Jost Schuchard

1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551921_0067

Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der
Universität München

Direktor: Professor Dr. O. Braun-Falco

ISOENZYMATISCHE UNTERSUCHUNGEN DER LAKTATDEHYDRO-
GENASEN VERSCHIEDENER HAUTTUMOREN MITTELS
POLYACRYLAMID - DISK - ELEKTROPHORESE

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
JOST SCHUCHARD
aus Spremberg
1974

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. S. Marghescu
Prof. Dr. O. Braun-Falco

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Eder

Dekan: Prof. Dr. Spam

Tag der mündlichen Prüfung : 30.7.1974



Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung

A. Thematischer Überblick	6
1. Einführung und Zielsetzung	6
2. Historisches	7
3. Gegenwärtiger Erkenntnisstand	11
a) LDH-Muster im Serum und Tumorgewebe bei Tumoren innerer Organe	11
b) Isoenzymatische Differenzierung benignen und malignen Tumoren	11
c) Isoenzymatische Veränderungen bei verschiedenen Dermatosen	12
B. Grundlagen	14
1. Die Laktatdehydrogenasen	14
a) Chemische Struktur	14
b) Chemische und physikalische Eigenschaften	15
c) Immunochemische Eigenschaften	16
d) Ontogenetische und histopathologische Veränderungen	17
e) Organverteilung und metabolische Verhältnisse	17
f) Anomale und außergewöhnliche Isoenzyme	18
2. Die Polyacrylamid-Disk-Elektrophorese	18
a) Entwicklung und Charakteristika	18
b) Theoretische Grundlagen	21

II. Material und Methodik

A. Patientengut und Materialgewinnung	27
B. Methodischer Überblick	27
C. Homogenisation des Exzisionsmaterials und Extraktion der Proteine	27

D. Vorbereitung und Einstellung der Substanzlösung	28
E. Elektrophoretische Trennung	28
1. Apparative Ausrüstung	28
2. Gele	29
3. Durchführung der PAA-Disk-Elektrophorese	32
4. Entfernung der Gele aus den Gelröhrchen	35
F. Qualitative Auswertung der Gelsäulen	35
1. Kolorimetrisch	35
2. Photometrisch	36
G. Überprüfung der Methodik	37
III. Ergebnisse	41
Das LDH-Isoenzymogramm	
A. der gesunden Haut	41
B. des Basalioms	42
C. der seborrhoischen Warze	45
D. des spinozellulären Karzinoms	47
E. im Serum gesunder Probanden	48
F. im Serum basaliomkranker Patienten	49
IV. Diskussion	51
V. Zusammenfassung	63
VI. Literaturverzeichnis	64

I. Einleitung

A. Thematischer Überblick

1. Einführung und Zielsetzung

Während zahlreiche Untersuchungsergebnisse über das Isoenzymogramm der Laktatdehydrogenasen (LDH) in verschiedenen Neoplasmen innerer Organe vorliegen, blieb die Frage nach dem LDH-Isoenzymogramm und damit den metabolischen Verhältnissen in verschiedenen Hauttumoren bisher im wesentlichen unbeantwortet. Das Ziel dieser Arbeit war es, das LDH-Isoenzymogramm in verschiedenen Hauttumoren zu ermitteln und mit dem der gesunden Haut zu vergleichen. Als Methode wurde die Polyacrylamid-Disk-Elektrophorese verwendet, welche sich durch eine besonders gute Kombination von elektrophoretischer Beweglichkeit mit Konzentrierungs- und Molekularsiebeffekt als genaue analytische Methode mit hoher Trennschärfe im Mikro- und Submikrobereich auszeichnet und somit den konventionellen Methoden überlegen ist.

Zur Untersuchung gelangten Exzisate von Basaliomen und Verucae seborrhoeae, deren LDH-Isoenzymogramme mit denen der gesunden Haut sowie denen des Serums von Patienten mit Basaliomen und von gesunden Probanden verglichen wurden. Außerdem wurde ein Vergleich mit dem LDH-Muster des spinözellulären Karzinoms angestrebt, um somit möglicherweise Anhaltspunkte für Unterschiede der glykolytischen Verhältnisse zwischen diesen Hautneoplasien unterschiedlicher Dignität zu finden.

Eine gleichzeitige histologische Kontrolle als diagnostischer Hauptparameter sollte mögliche Fehldeutungen ausschließen und ermöglichen, der Frage nach eventuellen Beziehungen zwischen histologischen und isoenzymatischen Befunden nachzugehen.

2. Historisches

MEISTER (134) erkannte 1950 als Erster die Heterogenität der LDH, als er bei Untersuchungen an kristallinen Ochsenherzenzymen mittels Trägerelektrophorese eine schnellere Komponente A, zu welcher er die gesamte enzymatische Aktivität zählte, und eine langsamer wandernde Komponente B beobachtete.

NEILANDS (140) registrierte 1952 auch bei dieser zweiten Komponente, welche er C nannte, enzymatische Aktivität. VESELL und BEARN (207) fanden 1957 drei deutliche Komponenten bei der Untersuchung von Humanserum mittels Stärkeblock-Elektrophorese, während zur gleichen Zeit SAYRE und HILL (189) zu ähnlichen Resultaten mittels Papier-Elektrophorese und Gradientenelutions-Chromatographie gelangten. Im gleichen Jahr, also 1957, veröffentlichten WIELAND, PFLEIDERER und JECKEL (154, 223, 224) die ersten Ergebnisse ihrer ausgedehnten Untersuchungen über die physikalischen und chemischen Unterschiede der einzelnen LDH-Fraktionen. Hierbei gelangte ihnen mittels Papier- und Stärkeblock-Elektrophorese der Nachweis von 5 verschiedenen Proteinen mit LDH-Aktivität. Diese Ergebnisse wurden durch mehrere Arbeiten anderer Autoren bestätigt (77, 158, 177, 208).

WIELAND et al. (226) fanden 1959, daß minimale Mengen enzymatischer Gemische in kurzer Zeit im elektrischen Feld auf der Zelluloseazetatfolie getrennt und die einzelnen LDH-Proteine dann eluiert und quantitativ in einem optischen Test, der auf der Bestimmung der Hydrogenisierungsrate von Brenztraubensäure durch NADH basiert, ausgewertet werden können.

Von besonderer Bedeutung war dann der Nachweis organotypischer Isoenzymmuster. WIELAND et al. (225) sowie MARKERT und MÖLLER (124) konnten 1959 nämlich zeigen, daß fast sämtliche tierischen und menschlichen Organe 5 LDH-Isoenzyme und die korrespondierenden Fraktionen dieselbe elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit besitzen, dabei aber jeweils einen charakteristischen Verteilungstyp für jedes Organ aufweisen. Nomenklatorisch gaben WIELAND et al. (223) dabei der elektrophoretisch am schnellsten wandernden anodischen Komponente die Nummer 1 und der langsameren kathodischen Komponente die Nummer 5, wobei sie die Bezeichnung mit dem Hinweis begründeten, daß bis dahin keine

schneller wandernden, jedoch schon langsamer wandernde Komponenten als die 5 bisher determinierten Fraktionen registriert worden seien. Im Gegensatz dazu kennzeichneten PLAGEMANN et al. (158) sowie APPELLA und MARKERT (5) die langsamste, kathodennahe Fraktion als LDH 1 und die schnellste, anodennahe als LDH 5. Andere Bezeichnungen (183, 216) bezogen sich auf die Serumproteine mit gleichem isoelektrischen Punkt, wobei die 5 LDH-Isoenzyme als Alpha 1-, Alpha 2-, Beta-, Gamma 1- und Gamma 2-Isoenzyme benannt wurden.

In dieser Arbeit wird entsprechend der heute gebräuchlichen Numerierung die elektrophoretisch am weitesten wandernde, anodische - d.h. mit der höchsten negativen Ladung versehene - Komponente als LDH 1 und die langsamste als LDH 5 benannt.

Weitere Beiträge zur Erforschung, Charakterisierung und Topographisierung der Laktatdehydrogenasen wurden im gleichen Zeitraum erbracht (77, 158, 177, 208, 209, 210, 218, 241):

In diesen Arbeiten konnte gezeigt werden, daß 1) die einzelnen Isoenzyme sich neben der elektrophoretischen Trennbarkeit in mehreren Punkten (chemische Struktur, Substratspezifität, Thermostabilität, Koenzymutilisation, Inhibitionseffekte und immunochemisches Verhalten) deutlich voneinander unterscheiden, und 2) die Laktatdehydrogenasen eine biologische Signifikanz besitzen (gewebetypische Verteilungsmuster, alters- und funktionsabhängige Isoenzymmuster, alternative Muster bei Gewebeumbau).

Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen war die Gewebedifferenzierung und -typisierung nach Isoenzymmustern. Dabei konnten die Organe zunächst deskriptiv 3 Typen zugeordnet werden, und zwar dem:

- 1) Herzmuskeltyp: Elektrophoretisch schnelle Isoenzyme (LDH 1 + 2),
- 2) Intermediärtyp: Isoenzyme von intermediärer Mobilität (LDH 2 - 4),
- 3) Skelettmuskeltyp: Langsame Isoenzyme (LDH 4 + 5).

WACHSMUTH et al. (216) konnten 1964 zeigen, daß zwar das einzelne LDH-Isoenzym nicht organspezifisch ist und sich weder elektrophoretisch noch

biochemisch oder chemisch von demselben LDH-Isoenzym eines anderen Organs unterscheiden läßt, das elektrophoretische Verteilungsmuster der LDH-Isoenzyme jedoch nach metabolischen Aspekten beim Erwachsenen gewebetypisch ist:

- 1) Vollzieht sich die Energiegewinnung eines Gewebes mehr unter aeroben Bedingungen, liegt also eine große O_2 -Versorgung bei hohem O_2 -Bedarf des Gewebes zu seiner vollen Leistungsfähigkeit vor, so herrschen die schnellen, anodischen LDH 1 und 2 vor (z. B. Herzmuskel, Gehirn, Erythrozyten, Niere) = Gruppe 1 nach PFLEIDERER und WACHSMUTH (155).
- 2) Läuft die Arbeit eines Gewebes mehr unter anaeroben Bedingungen ab, liegt also eine hohe Glykolyse vor, so dominieren die Fraktionen geringster anodischer Beweglichkeit, d. h. die maximale Aktivität verteilt sich auf die LDH 4 und 5 (z. B. Skelettmuskel, Leber, Epidermis, Granulozyten) = Gruppe 3.
- 3) In den Geweben mittlerer O_2 -Versorgung zeigen sich die Aktivitätsmaxima bei LDH 3 mit leichten Verschiebungen nach LDH 2 und/oder 4 = Gruppe 2 nach PFLEIDERER und WACHSMUTH (155). Zu dieser Gruppe gehören die meisten Organe: Tonsillen, Lymphknoten, Lymphozyten, Thymus, Neben- und Schilddrüse, Oesophagus, Lunge, Mamma, Milz, Pankreas, Nebenniere, Prostata, Hoden, Ovar, Uterus, Plazenta, Thrombozyten und Bindegewebe.
(13, 46, 47, 48, 79, 82, 89, 124, 155, 158, 162, 165, 182, 208, 212, 216, 225, 226, 230, 237, 238, 241).

Die Kenntnis der gewebetypischen Aktivitätsverteilung führte konsequent zur Frage nach alternativen Verschiebungen der Enzymmuster bei entzündlichen und neoplastischen Prozessen. Hierbei ergaben sich zwei Fragestellungen mit zwei Parametern: Finden sich Veränderungen a) der enzymatischen Aktivität und b) der Enzymmuster 1.) im Serum (was nur dann vorliegen konnte, wenn bei Erkrankungen eines Organs die für das betroffene Gewebe typischen Isoenzyme in erhöhtem Maße in das Serum gelangten) und 2.)

im erkrankten Gewebe?

Erste Ergebnisse über den beträchtlichen diagnostischen Wert der LDH-Muster im Serum, die den Beginn der Routineuntersuchungen beim Herzinfarkt, bei Lebererkrankungen, megaloblastischen Anaemien und anderen internen Krankheiten darstellten, erbrachten bereits 1958 und 1959 VESELL und BEARN (208), HESS (77) und WIEME (230). Daran schlossen sich zahlreiche Arbeiten über die LDH-Muster bei verschiedensten internen Krankheiten an, worin sich vielseitige Hinweise auf die LDH-Isoenzyme als diagnostischer Indikator für innere Erkrankungen ergaben (21, 34, 55, 56, 87, 119, 177, 186, 188, 197, 202, 231, 235, 240, 241, 246, 248). Danach kann eine Erhöhung der LDH 1 beim Herzinfarkt, der megaloblastischen Anaemie und der progressiven Muskeldystrophie sowie der LDH 5 bei der Virushepatitis, dem toxischen und obstruktiven Ikterus und der infektiösen Mononukleose als gesichert angesehen werden.

Später fand man, daß im Serum von Patienten mit Neoplasmen häufig eine erhöhte Gesamt-LDH vorliegt (16, 57, 86, 120, 135, 247). Auf der Suche nach einem tumorspezifischen LDH-Muster im Serum dieser Patienten erkannte man die Ineffizienz der üblichen Routineverfahren, da diese im Prinzip nur auf den unterschiedlichen Eigenschaften der LDH 1 und 5 basieren, ohne die anderen Isoenzyme erfassen und differenzieren zu können (52, 106, 190, 240). Lediglich die Hitzeinaktivierungsmethode stellte darunter eine gewisse Ausnahme dar, da mit ihr auch die intermediären Fraktionen 2 - 4 als Gruppe nachweisbar waren (242). Dem gegenüber erwiesen sich differente Untersuchungsmethoden wie die Agargel- und die Polyacrylamid-Disk-Elektrophorese als ausgezeichnete Trennverfahren, die alle 5 LDH-Frak-tionen klar trennten, so daß der exakte Nachweis von LDH-Isoenzym-mustern in den einzelnen Körpergeweben und -flüssigkeiten möglich wurde.

3. Gegenwärtiger Stand der Forschung

a) LDH-Muster im Serum und Tumorgewebe bei Tumoren innerer Organe

Die weiteren Untersuchungen deckten eine Diskrepanz zwischen den Aktivitätsmaxima im Serum tumorkranker Patienten und den Isoenzymmustern in Malignomen auf:

- 1) Im Serum Tumorkranker (besonders bei disseminierten malignen Erkrankungen, aber auch bei solitären Malignomen), welches häufig eine erhöhte Serum-LDH-Aktivität (SLDH) besitzt, fanden sich relativ häufig die intermediären Fraktionen 2 – 4, die man auch als Indifferenztyp bezeichnete (16, 25, 36, 57, 63, 80, 82, 107, 158, 222, 230, 232, 242, 247, 248).
- 2) Dagegen waren im Malignomgewebe a) vorwiegend die langsamen kathodischen LDH-Isoenzyme (also die Gruppe 3 mit den Fraktionen 4 und 5) akzentuiert (9, 11, 42, 43, 54, 66, 68, 70, 71, 107, 108, 147, 155, 164, 178, 181, 192, 193, 194, 198), während sich b) der Indifferenztyp mit den Fraktionen 2 – 4 relativ weniger (54, 68, 71, 84, 108, 201, 222) und c) der Verteilungstyp der Gruppe 1 mit den Banden 1 – 2 selten fand (71, 108, 146).

Bei der überwiegenden Zahl der viszeralen Malignome zeigte sich also eine Tendenz zu den glykolytischen Enzymen mit langsamer Mobilität, also ein Überwiegen der anaeroben Gewebsenzymatik.

b) Isoenzymatische Differenzierung benigner und maligner Tumoren

Bisher ist es nur in einigen Fällen gelungen, auf Grund differenter Enzymmuster eine tumorspezifische Dignitätsbestimmung zu erbringen. Die meisten Resultate lassen sich unter der Feststellung subsumieren, daß sich bei

den benignen Tumoren eine Betonung der mittleren Fraktion 2 - 4 manifestierte (11, 43, 54, 66, 71, 146, 200), während bei den malignen Tumoren der anaerobe Typ (LDH 4 und 5) vorherrschte (11, 43, 54, 66, 71, 109, 110, 180, 192, 193, 194, 200). Beim Zervixkarzinom hingegen beherrschten LDH 1 und 2 das enzymatische Bild (146). Ebenso fehlten bei bestimmten Mamma-, Ovarial- und Prostatakarzinomen die Verschiebung zum kathodischen Typ (71, 146). Somit fehlt ein einheitliches, malignomcharakteristisches LDH-Muster, wobei jedoch die häufige Tendenz zu den glykolytischen Fraktionen 4 und 5 imponiert.

Zur Vollständigkeit sei erwähnt, daß in neoplastischen Geweben auch ein anomales LDH-Isoenzym gefunden wurde (12, 115). Da weitere Bestätigungen nicht erfolgten, ergaben sich daraus keine Konsequenzen.

c) Isoenzymatische Veränderungen bei verschiedenen Dermatosen

Untersuchungen über den Metabolismus der gesunden Haut ergaben, daß in der Epidermis die anaerobe Glykolyse vorherrscht (32, 37, 122, 206, 221, 250, 251), während im Corium mehr die Tendenz zur aeroben Metabolisierung besteht (219, 221). Die Kennzeichnung der Proteine gesunder (1, 8, 103, 122, 123) und kranker Haut (103, 112, 122, 123) machte die Existenz hautspezifischer Eiweißkomponenten wahrscheinlich. Im Fall der LDH imponierte in der normalen Epidermis die Fraktion 4 (122), die in früheren Untersuchungen als Fraktion 5 dargestellt worden war (221, 251), während im Corium die intermediären Fraktionen stärker hervortraten (221). Quantitativ überwog die enzymatische Aktivitätenkonzentration der LDH in der Epidermis, während sie ins Hautinnere zu, also in Richtung des peripheren Blutstromes, kontinuierlich abnahm (218, 219, 220). Die Frage nach der Provenienz dieser Laktatdehydrogenasen ließ sich bei der normalen Epidermis als autochthon und bei kranker Haut als z. T. epidermogen, z. T. serogen beantworten (78, 121, 122, 205, 218, 219, 220). Nicht weitergeführte Untersuchungen

deuteten bei tumorösen Dermatosen eine isoenzymographische Differenzierungsmöglichkeit einiger Tumoren sowohl untereinander als auch von der normalen Haut an. Hierbei konnte zwischen dem Melanoblastom und dem Basaliom durch ein differentes Isoenzymogramm unterschieden werden: Während beim Melanoblastom die intermediären Fraktionen 2 - 4 überwogen, herrschte beim Basaliom die LDH 5 (welche später als LDH 4 erkannt wurde) vor (221).

Dem stehen andere Untersuchungsergebnisse gegenüber, welche sowohl für das Basaliom als auch für das Melanoblastom ein Hervortreten der Fraktionen 3 - 5 mit Überwiegen der LDH 3 ergaben (250).

In einer anderen Untersuchung konnten die LDH-Muster bei Karzinomen der Wangenschleimhaut von denen bei Leukoplakie im gleichen Bereich abgegrenzt werden (113). Weitere isoenzymatische Untersuchungen von Hauttumoren liegen noch nicht vor.

Der heutige Erkenntnisstand über strukturelle, physikalisch-chemische und immunochemische Eigenschaften der Laktatdehydrogenasen sowie deren Relationsverschiebungen in der Ontogenese und bei neoplastischen Prozessen ermöglichen es in Verbindung mit feineren analytischen Methoden, wozu die Polyacrylamid- Disk- Elektrophorese gehört, der Fragestellung nach bestimmten enzymatischen und damit metabolischen Veränderungen bei der Entstehung benigner und maligner Neoplasien nachzugehen und die entsprechenden Befunde richtig zu interpretieren.

Die im nächsten Kapitel aufgeführten Merkmale der Laktatdehydrogenasen sowie der Polyacrylamid- Disk- Elektrophorese sollen die Voraussetzungen dafür in kurzer Form wiedergeben.

B. Grundlagen

1. Die Laktatdehydrogenasen

a) Chemische Struktur

Die 5 LDH-Isoenzyme einer Spezies besitzen jeweils dasselbe Molekulargewicht von etwa 130.000 (168), unterscheiden sich jedoch in ihrer Aminosäurefrequenz und -Komposition. Jedes Enzym verbindet sich mit 4 Molekülen eines Koenzyms zu einem Molekül. Diese Subfraktionierung läßt sich mit 12 M-Harnstoff oder 5 M-Guanidin-Hydrochlorid erreichen, wobei dann das tetramere Enzym in 4 Monomere aufgespalten wird (5, 24, 30, 129, 216, 227, 228). Hierbei lassen sich zwei verschiedene Subfraktionen A und B unterscheiden, wobei LDH 1 und LDH 5 jeweils homogener Natur sind und aus 4 identischen Monomeren bestehen, während die intermediären Isoenzyme 2 – 4 Hybride darstellen, die sich aus den beiden Monomertypen A und B in verschiedener Komposition zusammensetzen (127, 228). Die Monomere A und B werden auch M (Muskel) und H (Herz) genannt.

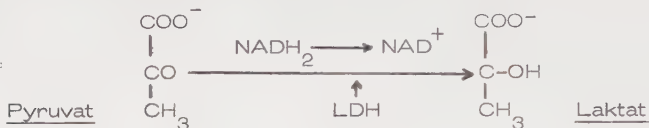
Die Subfraktion A und B haben jeweils ein Molekulargewicht von etwa 35.000 (30) und besitzen ebenfalls noch enzymatische Aktivität (127, 136). Die Synthese der beiden differenten Polypeptide A und B wird von zwei separaten Genen kontrolliert. Die Isoenzymmuster, welche von dem relativen Betrag der Subfraktion A und B abhängen, werden also von der relativen Aktivität der Gene kontrolliert (30, 73, 104, 126, 128, 195).

Für ein 6. Isoenzym, welches in Spermatozoen von Hodenhomogenaten postpuberaler Männer und bei anderen Spezies entdeckt wurde (18, 69, 243) und elektrophoretisch zwischen LDH 3 und LDH 4 wanderte, aber in den meisten Eigenschaften LDH 1 entsprach, wurde die Existenz eines 3. Monomertypes C postuliert (243). Experimentell müßten sich demzufolge nach Dissoziation von LDH 1 bis 5 und Reassoziierung mit C-Subfraktion andere Hybride mit dementsprechend anderer elektrischer Ladung und Wanderungsgeschwindigkeit nachweisen lassen, was bisher jedoch nicht gelungen ist (72). Über die Strukturauflklärung der LDH wurde in jüngster Zeit berichtet (187).

b) Chemische und physikalische Eigenschaften

Das Substrat der LDH, die systematisch zu den Oxidoreduktasen gehört, ist das L (+)-Laktat. Unklar ist, ob die LDH auch mit dem D (-)-Laktat reagieren kann (22). Einen inhibitorischen Effekt hat die D-Form allerdings nicht (158).

Es sei hinzugefügt, daß die Bezeichnung Laktatdehydrogenase in physiologisch-funktioneller Hinsicht eine Umkehrung darstellt, da bei der Glykolyse (Embden-Meyerhof-Schema) die Kette durch die Laktatdehydrogenase abgeschlossen wird, welche die Brenztraubensäure reduziert.



Die Michaelis-Konstante der langsamen Laktatdehydrogenasen ist höher als die der schnellen; also besitzen LDH 1 und LDH 2 eine größere Substrataffinität als LDH 4 und 5 (3, 75, 134). Mit hohen Substratmengen von Pyruvat ist die LDH hemmbar. Daraus konnte ein Determinierungsverfahren der relativen Anteile von LDH 1 und LDH 5 in einer Mischung beider Isoenzyme abgeleitet werden (158).

Bei einem pH-Wert von 7,0 und einer Pyruvat-Konzentration von 1,2 mM war die LDH 5 optimal aktiv, während nur 70 % der optimalen LDH 1-Aktivität wirksam war. Hingegen führte eine 0,15 mM-Pyruvatlösung zu größter Aktivität von LDH 1 und analog nur zu 70 % des LDH 5-Aktivitätsoptimum.

Die Konsequenz dieser Resultate ist, daß eine schnelle Akkumulation von Laktat nicht in Geweben vorkommen kann, die reich an LDH 1 sind (z. B. das Herz), und die komplette Oxidation der Glukose über den Zitrat-Zyklus und die Atmungskette verlaufen muß. Dagegen muß LDH dort effizienter sein, wo große Pyruvat-Konzentrationen vorliegen, welche LDH 1 ja hemmen. Also werden Gewebe mit hohem LDH 5-Anteil, z. B. der Skelettmuskel, eine schnelle Konversion von Pyruvat in Laktat und damit die Etablierung einer Sauerstoff-Schuld unter anaeroben Bedingungen erlauben (3, 30, 40). Letzteres trifft ebenso für die Haut zu.

LDH 1 und 2 zeigen vergleichbare Aktivitäten mit 0,7 mM-Pyruvat und 3,3 mM-2-Hydroxybutyrat, was sich als optimale Substratkonzentration für das normale Humanserum erwies, während LDH 4 und 5 eine Präferenz für Pyruvat zeigten (161, 162, 185). Aus der Aktivität mit 2-Hydroxybutyrat wurden dann einige klinische Untersuchungsverfahren abgeleitet (55, 56). Verbindungen wie p-Chloromercuribenzoat hemmen die LDH. Sulfit inhibiert besonders die schnellen Isoenzyme, also LDH 1 und 2. Mit Pyruvat als Substrat wird kristallisierte LDH von Oxamat kompetitiv, von Oxalat dagegen nicht kompetitiv gehemmt. Hohe Harnstoffkonzentrationen bewirken eine Dissoziation von LDH in Subfraktionen, niedrige dagegen verhalten sich wie ein kompetitiver Hemmer. Damit ist Harnstoff ein Differentialinhibitor, wobei der größte Effekt auf die langsamen Enzyme ausgeübt wird (24, 154, 161, 162, 179, 226).

Hinsichtlich der Temperatureffekte auf die Laktatdehydrogenasen ist LDH 4 und 5 thermolabiler als LDH 1 und 2. Zum einen ist die Wiederherstellung der LDH nach der elektrophoretischen Trennung bei LDH 4 und 5 weniger komplett, zum anderen verhalten sich LDH 4 und 5 bei erhöhten Temperaturen (mehr als 25 °) labiler, was sich in der Aktivitätsreduktion dieser Isoenzyme manifestiert. Auch aus dieser Eigenschaft lassen sich diagnostische Anwendungen ableiten. Bei erniedrigten Temperaturen (0 - 10 ° C) besitzen die schnellen Isoenzyme ebenfalls eine größere Stabilität, während die langsamen rasch inaktiviert werden (19, 105, 160, 162, 191, 213, 245).

c) Immunochemische Eigenschaften

Die homologen Isoenzyme 1 und 5 besitzen Antigenspezifität; es werden also spezifische Antikörper gegen die Monomertypen B (LDH 1) und A (LDH 5) gebildet. Die heterologen Isoenzyme LDH 2 - 4 weisen gewisse Gemeinsamkeiten in ihren Antigeneigenschaften auf; sie verhalten sich als Antigene so, daß sie die Produktion von Antikörpern stimulieren, die gegen alle 5 Isoenzyme gerichtet sind (28, 30, 95, 125, 129, 141, 142, 143, 158, 159). Es liegen somit 3 immunochemische Reaktionen vor:

LDH 1 — Anti - LDH 1

LDH 5 — Anti - LDH 5

LDH 2-4 — Anti - LDH 1 - 5

d) Ontogenetische und histopathologische Veränderungen

Der menschliche Embryo besitzt alle 5 Laktatdehydrogenasen, wobei jedoch die schnelleren Isoenzyme und besonders die LDH 3 dominieren. Während der ontogenetischen Entwicklung verschieben sich die Isoenzymrelationen zu LDH 1 und LDH 5 hin, so daß bald nach der Geburt das normale Gewebemuster der Laktatdehydrogenasen erscheint (94, 124, 126, 155, 244). Diese Differenzen zwischen embryonalem und adultem Gewebe erklären auch die parallelen Befunde beim Humanfetalmuskel und der menschlichen Muskeldystrophie, welche als Ausdruck eines Fehlens der histoenzymatischen Differenzierung und somit als zumindest partieller ätiopathogenetischer Faktor des dystrophischen Prozesses gedeutet werden kann (177). Hieraus ergibt sich eine umgekehrte Beziehung zu den LDH-Verhältnissen in enddifferenzierten und endarteten Geweben: Während bei den undifferenzierten embryonalen Geweben das Maximum bei den Laktatdehydrogenasen der aeroben Energiegewinnung liegt, findet sich bei enddifferenzierten Geweben meistens eine Tendenz zu den Laktatdehydrogenasen der anaeroben Gewebearbeit (155, 201).

e) Organverteilung und metabolische Verhältnisse

Der Vollständigkeit halber sei nochmals auf die Angaben über die metabolischen Verhältnisse und die Organverteilung der Laktatdehydrogenasen hingewiesen : 2, 6, 13, 14, 18, 46 - 49, 51, 66, 79, 82, 89, 96, 102, 124, 133, 155, 158, 162, 165, 182, 208 - 210, 212, 216, 225, 226, 230, 237, 238, 241).

f) Anomale und außergewöhnliche Isoenzyme

Bis auf ein 6. LDH-Isoenzym im postpuberalen Humanhoden (18, 69, 243), welches elektrophoretisch als LDH X zwischen LDH 3 und LDH 4 wanderte, und eine in frischen menschlichen Hautpräparaten gefundene 6. LDH-Fraktion (251), welche sich als LDH S vor der LDH 1 anodennah darstellte, konnte bisher noch kein anderes separates LDH-Isoenzym in anderen Organen gefunden werden. Allerdings liegen einige Berichte über Extrabanden vor, die aber bisher nicht reproduziert und verifiziert werden konnten. Mittels Stärkegel-Elektrophorese konnten so in verschiedenen Humangewebshomogenaten und in pathologischen Humanseren bis zu 8 distinkte Humanfraktionen beobachtet werden (17). Ebenfalls mit der Stärkegelelektrophorese ließen sich nach Zugabe von 0,005 M- beta- Merkaptoäthanol zu einem Mäusegewebsextrakt die 5 Hauptbanden in 15 Banden aufspalten; ein Artefakt konnte durch Reproduktion der gleichen Befunde mit der PAA-Elektrophorese ausgeschlossen werden (62). Ebenfalls bei Untersuchungen verschiedener Mäusegewebe fanden sich 7 anodische und 2 kathodische Fraktionen (3). Extrabanden mit LDH-Aktivität wurden auch aus Rattengewebe mit Papierelektrophorese und Zelluloseazetat-Elektrophorese separiert (228). Die Existenz anomaler Laktatdehydrogenasen in neoplastischen Geweben wurde bisher zweimal beschrieben (12, 115).

2. Die Polycrylamid-Disk-Elektrophorese (PDE)

a) Entwicklung und Charakteristika

a 1) Allgemeines

Analytische Methodik bedeutet zu einem erheblichen Teil Trennungsmethodik mit dem Ziel der Darstellung molekulareinheitlicher Substanzen. Besonders schwierige Trennprobleme ergeben sich für Makromoleküle auf Grund der geringen relativen Unterschiede zwischen den molekularen Einheiten. Sie werden außerdem im Bereich wichtiger biochemischer Verbindungen durch

die geringen zur Verfügung stehenden Substanzmengen zusätzlich kompliziert. Hier stellt nun die Disk-Elektrophorese eine Bereicherung der methodischen Möglichkeiten dar. Durch eine besonders gute Kombination von elektrophoretischer Beweglichkeit mit Konzentrierungs- und Molekularsiebeffekt erweist sich diese, vorwiegend analytische Elektrophorese als ausgezeichnete Trennmethode mit hoher Trennschärfe im Mikro- und Submikrobereich und ergänzt somit die in diesem Bereich häufig unzureichenden konventionellen Methoden (45, 132, 148, 150, 166, 171, 187).

a 2) Entwicklung

Ausgangspunkt zur Entwicklung der Disk-Elektrophorese waren zunächst Versuche mit Stärkegel, die zur Entdeckung charakteristischer Merkmale eines diskontinuierlichen Systems führten. 1957 ersetzte POULIK (163) Boratpuffer im Stärkegel mit Zitratpuffer bei beibehaltenem Boratpuffer in den Elektrodengefäßen und konstatierte dabei eine anionische Grenze. Dieses diskontinuierliche System führte zu einer weitaus besseren Trennung der Proteingemische.

Basierend auf den Resultaten von SMITHIES (196), der die molekulare Siebwirkung der Stärke erkannte, stellte HUNTER (91) 1958 Enzymogramme dar. 1959 veröffentlichten ORNSTEIN und DAVIS (148) ihre Ergebnisse von Experimenten mit dem früher von OSTER et al. (151) empfohlenen Polyacrylamid, welches gegenüber dem Stärkegel deutliche Vorteile aufwies. Kurz danach erschien ein davon unabhängiger Bericht von RAYMOND und WEINTRAUB (166), die ebenfalls das Polyacrylamid als Substituent des Stärkergels verwendeten.

Ihren Namen erhielt die Methode von den Diskontinuitäten der elektrophoretischen Matrix, nämlich des Polyacrylamids und des Puffersystems, sowie von den – zufälligerweise – scheibchenförmigen diskoiden Zonen der getrennten Protein zonen (67, 148, 150, 166).

a 3) Charakteristika der Polyacrylamid-Disk- Elektrophorese (PDE)

Die Matrix der PDE, das Polyacrylamid, bedingt die Vorteile dieser Methode gegenüber flüssigen, granulären oder festen Medien. Polyacrylamid, welches als synthetisches Polymerisationsprodukt einen Molekularsieveffekt bedingt, zeichnet sich aus durch:

1. chemische Stabilität und Indifferenz,
2. gute Transparenz bei üblichem Quervernetzungsgrad,
3. Porenvariabilität, d.h. Steuerbarkeit seiner in weitem Bereich variablen Struktur zur Erzeugung verschiedenster Porenweiten,
4. Fehlen von Adsorption und Elektroosmose,
5. Thermostabilität,
6. pH-Unabhängigkeit,
7. Unlöslichkeit in den meisten Lösungsmitteln,
8. gute Flexibilität und Haltbarkeit,
9. Analysenreinheit seiner Ausgangsstoffe,
10. gute Reproduzierbarkeit seiner Darstellung.

(39, 132, 148, 149, 167, 168, 171).

Von der kontinuierlichen Polyacrylamid-Elektrophorese unterscheidet sich die diskontinuierliche Polyacrylamid-Elektrophorese durch Einführung von pH- und Porengrößen-Diskontinuitäten innerhalb der Gelsäule. Diese Diskontinuitäten erzeugen den Konzentrierungseffekt.

Im oberen Teil der Säule werden die Substanzen zu einer scharf begrenzten Zone gesammelt, im unteren Teil der Säule werden sie aufgetrennt. Den oberen, kathodennahen Teil mit großen Poren, durch die die Substanzen ungehindert wandern, nennt man Konzentrier- oder Sammel-Gel (SPACER-GEL), den unteren anodennahen Teil mit kleinen Poren Trenn- oder Siebgel (RUNNING-GEL) (148, 150, 166, 172, 191, 236).

Das Trennvermögen der PDE beruht auf der Kombination von Molekularsieveffekt und Konzentrierungseffekt. Aus diesen Eigenschaften und der besonderen ap-

parativen Ausführung der Methode ergeben sich mehrere Vorteile gegenüber dem konventionellen zonenelektrophoretischen Verfahren:

1. geringerer Materialbedarf (1 – 100 mcg),
 2. Konzentrierung verdünnter Lösung,
 3. einfacher apparativer Aufwand (Glasröhrchen etc.),
 4. kurze Trennzeiten (ca. 60 Minuten),
 5. hohes Auflösungsvermögen für Moleküle verschiedenster Größe und Gestalt (Molekulargewicht zwischen $< 10^4$ bis $> 10^6$)
 6. gute Reproduzierbarkeit der Trennungen,
 7. einfache Nachweismöglichkeiten für Proteine, Proteide und Nukleinsäuren im allgemeinen sowie für Enzyme, Antigene, Polysaccharid-Ionen und radioaktiv markierte Elektrolyte im speziellen Bereich.
- (39, 132, 148 – 150, 168, 171, 172, 184)

Bei den Proteinen ermöglicht die PDE eine scharfe Trennung der Proteine, deren isoelektrischer Punkt unter einem pH von 8,9 und deren durchschnittlicher Durchmesser im Bereich von 20 – 40 nm liegt (132, 205). Neben analytischen Zwecken kann die PDE auch als präparatives Verfahren (im Milligramm-Bereich) und für ultramikroskopische Trennung (im Nano- und Pico-gramm-Bereich) verwendet werden (15, 67, 132, 234).

b) Theoretische Grundlagen

b 1) Bildung und Struktur des Polyacrylamid-Gels

(1) Allgemeines

Das Polyacrylamid-Gel ist ein Polymerisations- und Vernetzungsprodukt von Acrylsäureamid $\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ und einem Vernetzer, meist N, N'-Methylenbisacrylamid (NMBA) $\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2$.

Das dreidimensionale Maschenwerk des Gels bindet sich durch Vernetzung

nebeneinander entstehender Polyacrylamid-Ketten (Ko- oder Mischpolymerisation in Lösung). Dabei entwickeln sich zunächst zahlreiche Polymergelknäuel, in denen die Polyacrylamid-Ketten den Zustand maximal möglicher Entropie einnehmen. Die wachsenden Knäuel rücken zusammen und vernetzen dort miteinander durch Hauptvalenzen, wo multifunktionelle Verbindungen wie N, N'-Methylenbisacrylamid als Vernetzer in Polymerketten eingebaut sind und mit freien, funktionellen Gruppen am Ende anderer Ketten reagieren können. Aus einer verdünnten Polymer-Lösung entsteht also zunächst eine konzentrierte Lösung und dann das Gel. Viskosität, Elastizität und Festigkeit des Gels hängen teils vom Polymerisationsgrad (Kettenlänge) des Polyacrylamids, teils vom Vernetzungsgrad ab, d. h. von der Menge des eingebauten Vernetzers. Elastische und transparente Gele erhält man bei Gewichtsrelationen von Acrylamid: N, N'-Methylenbisacrylamid = 30 : 1, wobei die Konzentration des Acrylamids größer als 3 % sein muß (132, 150, 166, 170, 171).

(2) Porengröße

Polymerisations- und Vernetzungsgrad bestimmen die Dichte des Gel-Gitterwerkes, die sich als durchschnittliche Porengröße ausdrücken läßt. Die Porengröße spielt für die Trennung von Molekülen verschiedener Größe und Gestalt nach dem Molekularsiebeffekt eine wichtige Rolle. Anhand theoretischer Modelle (150) kann man berechnen, daß 7,5 %ige Polyacrylamid-Gele eine durchschnittliche Porenweite von 5 nm und 30 %ige Gele einen Porendurchmesser von etwa 2 nm aufweisen. Man kann daher mit der Wahl einer geeigneten Acrylamid-Konzentration die gewünschte Porengröße regulieren, vorausgesetzt, daß eine vollkommene Umwandlung von Monomer und Komonomer zu Polymer stattfindet (15, 83, 150, 168). Über den Einfluß des Vernetzers auf die Porengröße herrschen unterschiedliche Auffassungen. Während JONGKIND (93) und ZWISLER (249) eine merkliche Abhängigkeit von der Vernetzerkonzentration feststellten, soll nach ORNSTEIN (150) und RAYMOND und NAKAMICHI (169) der Vernetzer dem Gel nur mechanische Sta-

bilität verleihen.

(3) Polymerisations-Katalysatoren

Zur Ko-Polymerisation von Polyacrylamid-Gel für die Elektrophorese werden gewöhnlich bestimmte Katalysator-Redoxsysteme verwendet, die freie Radikale liefern. Für großporige Gele eignet sich dafür Riboflavin-N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamin (TEMED), während für kleinporige Gele Ammoniumperoxodisulfat-TEMED verwendet werden (151). TEMED, ein tertiäres aliphatisches Amin mit hohem Wirkungsgrad, beschleunigt als Akzelerator und Photokopolymerisator einer fluoreszierenden Röhre die Reaktion, und zwar bereits in geringen Konzentrationen (39, 167).

b 2) Theorie der Polyacrylamid-Disk-Elektrophorese (PDE)

(1) Allgemeines

Die PDE stellt ein hinsichtlich pH-Wert, Pufferzusammensetzung und Gel-Porengröße diskontinuierliches Trennsystem dar, welches Polyacrylamid als Träger verwendet. Hierbei weisen also sowohl die Pufferpaare unterschiedliche pH-Werte und Zusammensetzung als auch die Gel-Teile unterschiedliche Porengrößen auf. Diese Diskontinuitäten führen vor Trennbeginn zu sehr schmalen, d.h. hoch konzentrierten Startzonen, die für die Schärfe der Trennung entscheidend sind. Zwei physikalische Effekte sind für das hohe Auflösungsvermögen der PDE verantwortlich:

1. der Konzentrierungseffekt (101) und
2. der Molekularsiebeffekt (196).

Ersteres bedeutet, daß die Substanzen vor ihrer Trennung zu einer scharf begrenzten Zone konzentriert werden, während der zweite Effekt die Erscheinung umschreibt, daß die einzelnen Moleküle elektrophoretisch nicht nur nach ihrer elektrischen Ladung, sondern auch nach ihrer Größe (Molekular-

gewicht) und Gestalt (Tertiärstruktur) getrennt werden.

Da sich Gele gegenüber flüssigen Medien durch eine hohe Viskosität und damit durch hohe Reibungswiderstände auszeichnen, erfahren die im Gel wandernden Teilchen bei der PDE je nach ihren Dimensionen einen unterschiedlichen Reibungswiderstand, so daß sie nicht nur nach Ladung, sondern auch nach Molekülgröße und -gestalt "ausgesiebt" werden (196). Bei der PDE liegt also wie bei der Stärkegel-Elektrophorese eine Kombination zweier Trennprinzipien vor: der elektrischen Beweglichkeit und des Molekularsieb-effektes.

(2) Vorgänge während der Polyacrylamid-Disk-Elektrophorese (PDE)

Konzentrierung der Substanzlösung

Die PDE benützt üblicherweise kleine Säulchen aus Polyacrylamid-Gel, welches aus drei Teilen besteht:

1. ein großporiges Substanz- oder Antikonvektions-Gel, das die Substanzlösung enthält. Auf seine Polymerisation wird heute meist verzichtet. (SAMPLE-GEL)
2. ein großporiges Sammel-Gel, in welchem die Substanzen konzentriert werden (SPACER-GEL).
3. ein kleinporiges Sieb- oder Trenn-Gel, in welchem die Substanzlösungen getrennt werden. (RUNNING-GEL)
(148, 150, 166, 172, 191, 236).

Dazu kommen noch mit Pufferlösung gefüllte Elektrodengefäße, die Elektroden und ein elektrisches Netzgerät.

Die beiden Ionenarten, die während der Elektrophorese in Trennrichtung mit den Substanzen wandern und einen regulativen Effekt (101) erzeugen, kann man als Leit- und Folge-Ionen (leading and trailing ions) bezeichnen (236). Zu Beginn der Trennung befinden sich die Leitonen (die Chlor-Ionen) in al-

len drei Gelteilen, während die Folgeionen (die Glyzinat-Ionen) nur in den Pufferlösungen vorliegen. Durch die Wahl eines entsprechenden pH's für Substanz- und Sammel-Gel sollen sich die effektiven Beweglichkeiten "u" aller Ionenarten folgendermaßen anordnen:

$u(\text{LI}) > u(\text{Proteine}) > u(\text{FI})$, wobei Leitonen (LI), Protein- und Folgeionen (FI) dasselbe Ladungsvorzeichen tragen, nämlich als negative Teilchen zur gleichen Elektrode wandern. Unter Stromfluß eilen die LI infolge höherer Beweglichkeit den Proteinen und FI voraus und lassen eine Zone geringerer Leitfähigkeit hinter sich. Nach der Gleichung $E = \frac{J}{K} \left[\frac{\text{Volt}}{\text{cm}} \right]$, d. b. Feldstärke gleich Quotient aus Stromstärke J (Amp. cm^2) und spezifischer Leitfähigkeit K ($\Omega^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) ist die spezifische Leitfähigkeit umgekehrt proportional zur Feldstärke. Diese Zone gewinnt daher eine höhere Feldstärke, welche die Proteine und FI derart beschleunigt, daß sie hinter den LI mit gleicher Geschwindigkeit wandern und sich dadurch ansammeln. Nach der Gleichung $V = E(u) = \frac{u \times J}{K}$, welches die Geschwindigkeit des wandernden Teilchens angibt, bewegen sich alle Ionenarten mit gleicher Geschwindigkeit, wenn die Produkte aus den Feldstärken und Beweglichkeiten einander gleichen: $v = E(\text{LI}) \cdot u(\text{LI}) = E(\text{FI}) \cdot u(\text{FI})$. Hierbei bedeuten v = Geschwindigkeit, E = Feldstärke und u = Beweglichkeit. Es stellt sich somit ein regulierendes Gleichgewicht ein, das die Gleichheit der Produkte aufrecht erhält. Zwischen den LI und FI bildet sich daher eine Grenzschicht aus, die gleichzeitig die Fronten zwischen Gebieten hoher und niedriger Feldstärke darstellt. Man kann sie als eine von oben nach unten wandernde Schlierenfront im praktischen Versuch wahrnehmen. Diese Grenzschicht wandert nun rasch durch das Substanz- und Sammel-Gel. Da die Beweglichkeiten der Proteine zwischen denen der LI und FI liegen, die Proteine zwar weniger beweglich als die LI, aber doch beweglicher als die FI sind, werden die Proteine von der wandernden Grenzschicht erfaßt und zu einer schmalen, hoch konzentrierten Proteinzone zusammengestaucht. Die einzelnen Proteine liegen also hintereinander - nach ihren Beweglichkeiten in mikrodicken Scheiben geordnet - zwischen LI und FI (132, 150, 166, 213, 236).

Trennung der Substanzen

Erreicht nun die zwischen LI und FI wandernde Proteinzone die Grenze zwischen Sammel- und Trenn-Gel, so trifft sie dort auf zwei Diskontinuitäten: dem pH- und dem Porengrößen-Wechsel. Der 'neue' pH im Trenngel ist so gewählt, daß der Dissoziationsgrad der FI und damit deren Beweglichkeit um ein Vielfaches zunimmt (150). Dadurch gewinnen die FI eine Beweglichkeit, die der der LI gleichkommt. Die FI überholen nun alle Proteine und wandern nun direkt hinter den LI und vor den Proteinen. Nach dem damit einhergehenden Feldwechsel bewegen sich die Proteine in einem Gebiet einheitlicher Feldstärke und pH-Werte, unterliegen also einer echten Zonen-Elektrophorese, und werden durch die adäquat gewählte Porengröße des Gels nach Molekulargröße, -gestalt und -ladung aufgetrennt. So werden auch Proteine gleicher freier Beweglichkeit, doch unterschiedlichen Molekulargewichtes evident aufgelöst. Konzentrierungs- und Molekularsiebeffekte zusammen bewirken letztlich damit das hohe Trennvermögen der Disk-Elektrophorese (132, 150, 213, 236). Um die elektrische Neutralität und Pufferung des gesamten Gelsystems zu erhalten, wählt man als Gegenionen Kationen oder Anionen schwacher Basen oder Säuren.

(3) Puffer- und pH-System

Allgemein gilt bei der Wahl des entsprechenden pH-Wertes und der entsprechenden Pufferzusammensetzung eines Systems, daß diese eine maximale Trennung der Substanzen unter Erhaltung der Löslichkeit und der chemischen und biologischen Stabilität gewährleisten müssen. Ferner sollen die Substanzen bei den pH-Werten des Substanz-, Sammel- und Trenn-Gels die gleichen Ladungsvorzeichen wie die LI und FI tragen, der pH der Substanzlösung darf dabei den pH des Substanz- und Sammel-Gels nicht merklich verändern. Daher muß der pH der Substanzlösung vor dem Zumischen geprüft und gegebenenfalls auf mindestens $\pm 0,75$ pH-Einheiten des Puffers mit einem pH-Meter eingestellt werden (213, 236).

II. Material und Methodik

A. Patientengut und Materialgewinnung

Es wurden jeweils 22 Exzisate von Basaliomen und seborrhoischen Warzen, sowie 2 Exzisate eines initialen spinözellulären Karzinoms untersucht. Außerdem wurden zum Vergleich 5 Hautlappen von hautgesunden Patienten sowie 5 Seren gesunder Probanden und 5 Seren basaliomkranker Patienten enzymographisch verwertet. Das Humanserum wurde durch Zentrifugation (2500 U/min. über 10 min.) frisch entnommenen Venenblutes gewonnen.

B. Methodischer Überblick

Um das LDH-Isoenzymogramm von Basaliom- und Verrucoseborrhoica-Exzisaten zu bestimmen und diese mit dem LDH-Enzymmuster der normalen Haut und des Serums gesunder Probanden und basaliomkranker Patienten zu vergleichen, mußte

1. das Exzisionsmaterial homogenisiert und die Proteine extrahiert werden,
2. die Substanzlösung vorbereitet und eingestellt werden,
3. die Isoenzyme disk-elektrophoretisch getrennt werden,
4. das Isoenzymogramm der Gel-Säulen mittels Kolorimetrie und Photospektrometrie qualitativ ausgewertet werden.

C. Homogenisation des Exzisionsmaterials und Extraktion der Proteine

1. Das Exzismaterial, welches teilweise gleich nach der Exzision und teilweise nach Aufbewahrung in einer Kühltruhe (bei -10°C) verarbeitet wurde, wurde zunächst mit einer Schere in feine Stückchen zerschnitten und dann gewogen.
2. Die zerschnittenen Teilchen wurden in ein Ultra-Turrax-Glas gebracht und mit Sørensen-Puffer (pH = 7,8) im Verhältnis 20 : 1 versetzt, also 0,2 ml Sørensen-Puffer pro 10 mg Exzismaterial verwendet.

3. Die Suspension wurde mit dem Ultra-Turraxim Eisbad 3 x 20 sec. in 3-minütigem Abstand homogenisiert und
4. das Homogenat in verschlossenem Erlenmeyer-Kolben auf dem Magnetrührer im Einsschrank bei 4° C 16 Std. gerührt.
5. Danach wurde das Homogenat sofort 2 x 10 min. lang bei 2500 U/min. zentrifugiert und der Überstand dekantiert, während das Sediment verworfen wurde (4, 7, 20, 39, 153).

D. Vorbereitung und Einstellung der Substanzlösung

Zur Herstellung eines einheitlichen Eiweißgehaltes der Substanzlösung (Probe) mußte zunächst der Gesamteiweißgehalt des Überstandes mit der BIURET-Methode ermittelt werden. Damit die Substanzlösung den gleichen Puffer und pH-Wert sowie die gleiche Ionenstärke wie die Sammelgel-Lösung hatte, wurde sie mit flüssigem Sammelgel verdünnt.

Die Einzelproben wurden mit Sammelgel auf eine Eiweiß-Endkonzentration von 0,8 g% gebracht. Davon entfielen auf jedes Röhrchen 0,06 ml Versuchsmenge (39, 132, 149, 167).

E. Elektrophoretische Trennung

Die PAA-Disk-Elektrophorese (PDE) wurde entsprechend den methodischen Angaben von DAVIS durchgeführt (39).

(Ergänzende Literatur bei: 44, 45, 132, 151, 167, 191, 234).

1. Apparative Ausrüstung

Zur Aufnahme der Gele wurden Röhrchen aus alkaliarmen Glas verwendet, die 7 cm lang und einen inneren Durchmesser von 0,5 cm hatten. Beide Enden der Röhrchen waren plangeschnitten und wenig scharfkantig. Als Röhrchenhalter diente ein Elektrodengefäß aus Kunststoff (Polystyrol) von 5 cm Höhe und 9,5 cm Durchmesser, welches an seinem Boden 8 eingebohrte Löcher mit eingesetztem Gummiring als Dichtung zur leckfreien Halterung der Gelröhrchen enthielt.

Im Boden des anderen, anodischen Elektrodengefäßes und im Deckel des oberen kathodischen Elektrodengefäßes (mit den Vorrichtungen für die Glasröhrchen) befand sich je ein mit einem Platindraht umwickeltes Glasstäbchen als Platinelektrode, welche über 2 Kabel mit einem elektrischen Netzgerät in Verbindung standen.

Die ganze Apparatur (abgesehen vom Netzgerät) war durch 2 an einem Dreifuß in der Höhe verstellbaren Halterungen befestigt.

2. Gele

a. Physikalisch-chemische Eigenschaften der Grundstoffe

Die wichtigsten physikalischen und chemischen Eigenschaften der Ausgangsstoffe für die Polyacrylamid-Herstellung sind in Tab. 1 zusammengefaßt. Auf Grund der angeführten Eigenschaften wurden Acrylamid und dessen wässrige Lösungen lichtgeschützt in braunen Flaschen bei 4⁰ C gelagert. Dabei lag die Haltbarkeitsgrenze etwa bei 1 Monat. Ähnliches galt für die N, N'-Methylenbisacrylamid-Lösungen. Lösungen von Ammoniumperoxodisulfat waren nur etwa 1 Woche bei 4⁰ C haltbar.

Ständige pH-Überprüfungen wurden zur Kontrolle der Haltbarkeit und Eignung durchgeführt.

Eigenschaften	Acrylamid	N,N'-Methylen-bisacrylamid	N,N,N',N'-Tetramethyl-äthylendiamin
Formel	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}$ $\quad\quad\quad\text{CH}_2$ $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}$	$(\text{CH}_3)_2\text{N}-\text{CH}_2$ $(\text{CH}_3)_2\text{N}-\text{CH}_2$
Mol.-gewicht	71,08	154,16	116,20
Aussehen	weiße Kristallsubst.,	weiße Kristallsubstanz	farbloses bis leicht gelbl. Öl
Geruch	----	----	ammoniakalisch
Löslichkt.	H ₂ O, Methanol Aceton, CHCl ₃	H ₂ O	mischbar mit H ₂ O u. organ. Lösungsmitteln
Dichte	1,122	----	0,777
Veränderg. bei Aufbewahrung	langsame, spontane Polymerisat.	langsame, spontane Polymerisation	Gelbfärbung

Tab. 1

Eigenschaften der Ausgangsstoffe für die Polyacrylamidgel-Herstellung,
nach MAURER (132)

b. Herstellung der Gele

b 1) Stammlösungen

Folgende Substanzen wurden verwendet:

Acrylamid

Bis = N, N'-Methylenbisacrylamid

Temed = Tetramethyläthylendiamin

Ammoniumpersulfat

Bromphenolblau

Riboflavin

Glykokoll (nach Sørensen)

Tris = Tris (hydroxymethyl-) aminomethan

HCl = 1 N-HCl

a. d. = aqua bidestillata

Folgende Stammlösungen wurden beim Ansetzen der Gele verwendet:

A. HCl 48,00 ml
 Tris 36,60 g
 Temed 0,23 ml
 a.d., ad 100,00 ml
 pH : 8,9

B. HCl 48,00 ml
 Tris 5,98 g
 Temed 0,46 ml
 a. d., ad 100,00 ml
 pH : 6,7

C. Acrylamid 28,000 g
 Bis 0,735 g
 a.d., ad 100,000 ml
 abfiltrieren

D. Acrylamid 10,0 g
 Bis 2,5 g
 a.d., ad 100,0 ml
 abfiltrieren

E. Riboflavin 4,0 mg
 a.d., ad. 100,0 ml
 ca. 4 Wo. bei 4° C haltbar

F. Ammoniumpersulfat 140 mg
 a.d., ad 100 ml
 jedes Mal vor Gebrauch
 anzusetzen

G. Bromphenolblau 10 mg
a.d., ad 100 ml

H. Tris 6,0 g
Glykokol 28,8 g
a.d., ad 100,0 ml
pH : 8,3

ad (H): Bei 4° C etwa 4 Wochen haltbar. Zur PDE Verdünnung 1 : 10 herstellen! Den verdünnten Puffer nur zu 1 Lauf verwenden!

b 2) Gelansatz I: Sammelgel-Bereitung

Zur Sammelgel-Bereitung wurden folgende Stammlösungen in folgendem Verhältnis gemischt:

- 1 Teil B
- 2 Teile D
- 1 Teil E
- 4 Teile aqua bidest.

Der Gelansatz wurde sodann im Dunkeln aufbewahrt. Pro Röhrchen wurden 0,115 ml Sammelgel benötigt.

b 3) Gelansatz II: Trenngel-Bereitung

Zur Trenngel-Bereitung wurden folgende Stammlösungen in folgendem Verhältnis gemischt:

- 1 Teil A
- 2 Teile C
- 3 Teile aqua bidest.
- 4 Teile F

Wie bei der Sammelgel-Bereitung, so wurde auch hier anschließend mehrmals gut gemischt.

Pro Röhrchen wurden 1,25 ml Trenngel benötigt.

3. Durchführung der PDE

(1) Die Röhrchen wurden in mit aqua dest. angefeuchtete Gummistopfen gestellt, die dicht und plan über den Rand gestülpt wurden. Der eingravier-

te Markierungsring in den Röhrchen kam dabei nach unten.

- (2) Das Trenngel wurde aus dem Eisschrank genommen und kurz bei Zimmertemperatur stehengelassen.
- (3) Das Trenngel wurde bis etwa 2 cm unter den Röhrchenrand (ca. 1,25 ml) eingefüllt.
- (4) Das Trenngel wurde mit ca. 0,1 ml aqua destillata überschichtet, um eine plane Oberfläche zu erhalten. Dem aqua dest. waren 3 – 5 Tropfen 0,01 %iges Bromphenolblau zugegeben, das die Ionenfront anfärben und den Stand der Elektrophorese anzeigen sollte.
- (5) Die Gelröhrchen wurden 45 Min. vor einer Leuchtstoffröhre (15 Watt Osram Universalweiß und BBR-Vorschaltgerät für 1 Leuchtstoffröhre 15 Watt P 222) polymerisiert.
Ungefähr 5 Min. nach Beginn der Bestrahlung konnte man eine opaleszierende Eintrübung des Gels als Zeichen der beginnenden Photopolymerisation sehen.
- (6) Das Wasser wurde abgossen und die Röhrchen auf Filtrierpapier vorsichtig ausgeklopft.
- (7) Jeweils 0,115 ml Sammelgel wurden eingefüllt und der Rest der Sammelgellösung zur späteren Weiterverwendung (Eiweißverdünnung) im Dunkeln aufbewahrt.
- (8) Es wurde erneut mit aqua dest. (siehe Pkt. 4) überschichtet.
- (9) Es wurde diesmal 15 Min. vor der Leuchtstoffröhre polymerisiert (wie unter 5).
- (10) Das Wasser wurde wieder abgossen, das Röhrchen vorsichtig abgeklopft.
- (11) Nun wurden nach erneutem Mischen ca. 150 ml Puffer der Stammlösung H in die untere anodische Schale gegossen, bis die Elektrode bedeckt war.

- (12) Die Gummistopfen wurden von den Gel-Röhrchen entfernt und die Gel-Röhrchen von unten durch die mit Puffer angefeuchteten Gummistopfen des konvexen Schalenbodens hineingesteckt.
- (13) Es wurde jeweils ein Tropfen Puffer an das schalenferne freie Ende der Gel-Röhrchen mit einer Pipette gehängt, damit das System luftblasenfrei bleiben konnte.
- (14) Durch Verschieben der am Dreifuß befestigten Halterung wurde das obere Elektrodengefäß so weit nach unten verschoben, daß die Röhrchen ca. 1 cm tief in den Puffer des unteren kathodischen Gefäßes eintauchten.
- (15) Nun wurden jeweils 0,06 ml Probenlösung, welche auf eine Gesamteiweiß-Endkonzentration von 0,8 g% verdünnt worden war, in den oberen Röhrchenteil eingefüllt.
- (16) Mit einer Mikropipette (5 cmm) wurde jeweils 2 mal vorsichtig mit Puffer überschichtet, um ein späteres Abschwemmen der Eiweißverdünnung zu vermeiden.
- (17) Dann wurde mit einer 0,1 ml-Pipette äußerst vorsichtig das obere Röhrchenende mit Puffer ausgefüllt.
- (18) Das obere kathodische Gefäß wurde nun ebenfalls mit Puffer aufgefüllt, bis die Elektrode mit Puffer gut bedeckt war.
- (19) Der Kathodendeckel wurde aufgesetzt.
- (20) Das Netzgerät wurde eingeschaltet, also Spannung angelegt und die Stromstärke auf 4 mA pro Säule eingestellt (insgesamt 32 mA) und konstant gehalten, wozu öfters kontrolliert und anfangs nachreguliert werden mußte. Diese Maßnahmen waren erforderlich, um den Spannungsabfall im ganzen Trennfeld (Gel) selbst konstant zu halten und somit eine exakt reproduzierbare Elektrophorese erreichen zu können.

- (21) Nach einer Laufzeit von etwa 45 Min. erreichte die Bromphenolblau-Scheibe die etwa 1 cm vor dem Röhrchenende eingravierte Markierung, woraufhin das betreffende Gelröhrchen aus dem Elektrodengefäß entfernt wurde und an seiner Stelle ein massiver Glasstöpsel zur Dichtung eingesetzt wurde.
- (22) Die herausgenommenen Gelröhrchen wurden sofort in Eiswasser gelegt.
- (23) Da die jeweiligen Elektrophoresen der einzelnen Gele unterschiedlich schnell laufen, mußte jedes Röhrchen beobachtet werden und bei Rausnahme eines Röhrchens die Spannung unterbrochen, das Röhrchen herausgezogen und die Spannung wieder unter Reduktion der Spannung (Spannungswegnahme pro Röhrchen) angelegt werden.

4. Entfernung der Gele aus den Gelröhrchen

Den technisch schwierigsten Teil der Disk-Elektrophorese stellte die manuelle Entfernung der Gelsäulen aus den Gelröhrchen dar. Mit einer langen rostfreien Nadel wurden die Gelsäulen unter drehenden Bewegungen im Eiswasser vorsichtig herausgelöst. Es zeigte sich, daß nach einer 5-minütigen Lagerung der Gelröhrchen im Eiswasser die Gelentfernung am leichtesten durchführbar war. Praktischweise wurde so vorgegangen, daß die lin. Hand das Gelröhrchen im Eiswasser kontinuierlich drehte und die re. Hand die Nadel langsam zwischen Röhrcheninnenwand und Gel vorbeischoob, wobei sich die Nadel spiralig entlang der Röhrcheninnenwand bewegte. Nach erfolgter Lösung rutschten dann die Gelsäulen von selbst aus dem Röhrchen.

F. Qualitative Auswertung der Gelsäulen

1. Kolorimetrische Auswertung

Zur Herstellung der Standard-Inkubationslösung (26) für sämtliche LDH-

Aktivitäten wurden die folgenden Substanzen benötigt:

- (1) 0,05 M-Trispuffer (pH : 7,4) = Tris
- (2) 2,14 M -Natriumlaktat = Laktat
- (3) 0,2 % -Phenazinmethosulfat = PAMS
- (4) Nicotinamidadenindinukleotid =NAD
- (5) 0,06 - KCN = KCN
- (6) Nitroblau-Tetrazolium = NBT

Die Standard-Inkubationslösung (26) setzte sich zusammen aus:

- (1) 35,0 ml Tris
- (2) 1,0 ml Laktat
- (3) 0,4 ml PAMS
- (4) 25,0 mg NAD
- (5) 3,0 ml KCN
- (6) 19,0 mg NBT

Hierbei wurde besondere Aufmerksamkeit auf die möglichst feindisperse Lösung des schwer löslichen Nitroblau-Tetrazoliums gelegt.

Die Inkubation der Gelsäulen wurde bei Zimmertemperatur (22 ° C) 30 Min. lang in einem dunklen Raum durchgeführt und anschließend in einem Entfärbegerät gewaschen, der aus folgenden Substanzen bestand:

- (1) 50 % Alkohol (96 %-Äthanol)
- (2) 40 % aqua destillata
- (3) 10 % Eisessig (96 %-Essigsäure)

Es zeigten sich 5 Banden, die deutlich getrennt waren. Die Gelsäulen wurden vorsichtig in ein Glasröhrchen gebracht, welches mit aqua dest. aufgefüllt und dann mit einem Korken verschlossen wurde.

2. Photometrische Auswertung

Das so gewonnene Pherogramm wurde dann am Photometer Eppendorf mit Hilfe eines speziellen Zusatzgerätes für Disk-Gele (Pherogrammauswerter 2602 Eppendorf) in Diagramme übertragen. Hierbei wurde die Gelsäule mit

konstanter Geschwindigkeit kontinuierlich an einem Bündel paralleler Lichtstrahlen (Spalt) waagrecht vorbeigeführt (direkte Densitometrie). Monochromatisches Licht, das im Absorptionsmaximum der zur Anfärbung der Lak-tatdehydrogenasen verwendeten Farbstoffe lag, leuchtete den Spalt aus. Es wurde ein Filter von der Längenwelle 546 nm und eine Blende $6 \times 0,5$ mm verwendet. Das durchfallende Strahlenbündel gab dann über eine Photozelle Impulse auf einen angeschlossenen Direktschreiber mit Integrator (Transformationsstufe 1853 und Kompensationsschreiber 4410 und 4412 Eppendorf), der über eine logarithmische Umformung die Extinktionskurve auf Registrierpapier aufzeichnete.

Die Auswertung erfolgte also synchron durch Spektrophotometrie und Extinktionsdiagnostik.

G. Überprüfung der Methodik

Um der Frage nach den kritischen Punkten in der Materialgewinnung und -Methodik und ihren möglichen variierenden Einflüssen auf die Ergebnisse nachzugehen, wurden mehrere Simultan- und Sequentialuntersuchungen einer Probe durchgeführt. Um auszuschließen, daß ein relativ großer Anteil von gesundem Gewebe im Exzusat das Ergebnis verändern könnte, wurden einige Präparate so halbiert, daß beide Hälften etwa gleich große gesunde und pathologische Gewebssareale enthielten. Während die eine Hälfte dann nach der besprochenen Methode zubereitet wurde, erfolgte die Zubereitung der anderen Hälfte erst nach gründlicher, bestmöglicher Entfernung makroskopisch erfaßbarer gesunder Gewebepartien. Die Simultanuntersuchung dieser beiden so gewonnenen Ausgangsmaterialien ergab annähernd gleiche Phero- und Diagramme, so daß diesem Faktor keine besondere Bedeutung zugeschrieben werden mußte. Prinzipiell wurde jedoch so vorgegangen, daß das untersuchte Material möglichst wenig gesunde Gewebspartien enthielt. Bei der Untersuchung von Material, welches nach Lagerung bei verschiedenen Temperaturen zwischen -15°C und $+4^{\circ}\text{C}$ verarbeitet wurde, ergab sich als beste Temperatur zur Konservierung des Operationsmaterials eine Temperatur von -10°C , wobei sich die Ergebnisse am konstantesten reproduzieren ließen. Nach einer Lagerung bei Temperaturen über 0°C

zeigten sich deutliche Aktivitätsverluste im Diagramm (Vergleiche 160, 245).

Die Frage, ob es einen optimalen zeitlichen Verarbeitungsmodus bei der Materialzubereitung und anschließenden pherographischen Untersuchung gibt, wurde durch mehrere Versuche geprüft. Dabei wurde anhand einiger Präparate folgendes Versuchsschema angewendet:

Dasselbe Operationsmaterial (Exzizat eines Basalioms oder einer seboreischen Warze) wurde halbiert und

A) anschließend einmal direkt verarbeitet und

B) zunächst bei -10°C eingefroren.

Material A wurde wiederum halbiert und dann a) sofort pherographisch untersucht und b) wiederum eingefroren.

Das Material Ab wurde dann nach einigen Tagen pherographisch untersucht, wobei ein übriggebliebener Materialanteil nach weiteren Tagen Lagerung nochmals untersucht wurde. Von dem direkt verarbeiteten Ausgangsmaterial A erhielten wir somit 3 Pherogramme und Diagramme. Das Ausgangsmaterial B wurde analog untersucht. Dabei wurde a) ein Teil von B nach einigen Tagen Lagerung verarbeitet und untersucht und b) der andere Teil nach weiteren Tagen Lagerung zubereitet und pherographisch untersucht. Ein übriggebliebener Anteil von Ba wurde nach einigen weiteren Tagen Lagerung untersucht. Somit erhielten wir vom Ausgangsmaterial B ebenfalls 3 Pherogramme und Diagramme.

Die vergleichende Untersuchung dieser 6 Pherogramme und Diagramme, jeweils bei mehreren Proben durchgeführt, ergab folgenden Befund:

Qualitativ ergaben sich bei allen 6 Phero- und Diagrammen eines identischen Materials keine Veränderungen. Quantitativ zeigte sich jedoch bei zunehmender Lagerungsdauer eine Abnahme der Isoenzymaktivitäten, insbesondere der langsam wandernden Fraktionen, wobei es jedoch ohne Bedeutung war, ob das Material direkt nach Exzision oder erst nach einigen Tagen Lagerung in der Tiefkühltruhe verarbeitet und untersucht wurde. Um quantitative Differenzen weitgehend zu vermeiden, wurde eine maximale Lagerungsdauer von 3 Tagen eingehalten. Schließlich wurden zur Überprüfung der einzelnen

methodischen Schritte mehrere Präparate mehrfach synchron untersucht. Hierbei erwiesen sich als Faktoren, die eine genaue Reproduzierbarkeit verhindern können:

I. Der Reinheitsgrad von Acrylamid kann sich je nach Herkunft beträchtlich unterscheiden. Bei Alterung wässriger Lösungen kommt es infolge Hydrolyse zu pH-Veränderungen. Ferner verursacht freie Acrylsäure einen Abfall der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit (132). Deswegen führten wir ständige pH-Kontrollen der Lösungen und eine strikte Einhaltung der im Abschnitt Methodik beschriebenen Zeitnormen für die Verwertbarkeit der Ausgangslösung durch. Da der Trennungserfolg stark vom Reinheitsgrad der Gelsubstanzen abhängt, war eine Aufbewahrung aller Lösungen in braunen Flaschen bei 4⁰ C unbedingt erforderlich. pH-Überprüfungen wurden deswegen vor jedem Versuch und nach jeder Aufbewahrung durchgeführt.

II. Als weitere potentielle Fehlerquellen bei der Sammel- und Trenngel-Zubereitung zeigten sich bei den Simultanuntersuchungen, entsprechend den Beschreibungen von MAURER (132): Reinheitsverlust der Ausgangslösung, sogen. Altern der Lösungen, pH-Differenzen, unsorgfältiges Wasserüberschichten, ungleichmäßige Gelpolymerisation, Veränderung bei längerem Aufbewahren der Gele, Vermischen der Substanzlösung mit überstehendem Puffer, Ungenauigkeiten der Proteinkonzentration der Substrate, Entwicklung von stärkerer Joulescher Wärme im Puffersystem und Verunreinigung der Substanzlösung mit Puffer.

III. Zur exakten Reproduzierbarkeit der Pherogramme bei identischem Substrat erwies sich ein konstanter Spannungsabfall im ganzen Trenngel als unbedingt notwendig. Um dies zu erreichen, mußten wir die Spannung konstant auf die beschriebene Größe nachregulieren, was zu einer erheblichen Inanspruchnahme während der eigentlichen Elektropherographie führte.

Im Gegensatz zu anderen Berichten (97) fanden wir keine schwierig erfaßbaren unspezifischen Anfärbungen, so daß die Deklaration der einzelnen LDH-Isoenzyme keine Schwierigkeiten bereitete.

III. Ergebnisse

Zur Sicherstellung der Resultate wurde ein Teil der Proben mehrfach untersucht, wobei sich im wesentlichen eine Kongruenz der Ergebnisse ergab. Da jeder Bande im Gel-Pherogramm ein Extinktionsmaximum im spektrophotometrischen Diagramm entsprach, konnten beide Befunde korreliert und synchron ausgewertet werden. Die Bezifferung der Isoenzyme erfolgte gemäß der Konvention von der Anode zur Kathode hin.

A. Das LDH-Isoenzymogramm der gesunden Haut

Die disk-elektrophoretischen Untersuchungen der Hauthomogenate 5 hautgesunder Patienten (chirurgisches Material) ergaben folgende Ergebnisse:

1. Pherogramme

Im Pherogramm (mit LDH-Standard-Inkubationslösung angefärbte Gelsäule) waren 4 distinkte Banden erkennbar, die als Isoenzyme 2 – 5 identifiziert werden konnten. Bei allen Proben waren die Banden 2 – 4 am stärksten ausgebildet, während die kathodennahe Bande 5 schwächer sichtbar war. Innerhalb der Gruppe LDH 2 – 4 dominierte in allen Fällen die Bande 4. Relativ schwächer war die Bande 3 ausgeprägt, während die Bande 2 in dieser Gruppe am schwächsten vorhanden war.

2. Diagramme

Entsprechend den pherographischen Ergebnissen zeigten sich spektrophotometrisch 4 Extinktionsmaxima, wobei sich die Aktivitätsrelationen in der abnehmenden Reihenfolge LDH 4 > 3 > 2 verifizieren ließen. Bande 5 zeigte die geringste Extinktion und ließ im Diagramm den kleinsten Ausschlag erkennen. LDH 1 war nicht sicher nachweisbar.



Abb. 1 :

Diagramm des LDH-Musters der gesunden Haut. Innerhalb der Fraktionen 2 - 4 überwiegt die LDH 4.

B. Das LDH-Isoenzymogramm des Basalioms

Die disk-elektrophoretischen Untersuchungen der Homogenate von 22 Basaliomexzissaten ergaben folgende Ergebnisse:

1. Pherogramme

Die pherographischen Ergebnisse ließen sich nach der Praeferenz der Banden in 2 Gruppen gliedern:

- (1) Die intermediären Fraktionen 2 - 4 sind am deutlichsten sichtbar (19 Fälle).
- (2) Die Isoenzyme 4 und 5 sind am stärksten ausgebildet (3 Fälle),
- (1) Innerhalb der 1. Gruppe konnte entsprechend der überwiegenden Bande wiederum unterteilt werden in:

a) die mittlere Bande (LDH 3) und

b) die Bande 4 besitzen jeweils die größte Dichte und Breite.

- (2) Bei der 2. Gruppe war in allen Fällen die Bande 4 stärker ausgeprägt als die Bande 5.

Zusammenfassend konnte somit zwischen einem pherographischen Bild mit Betonung der Bande 3 (Gruppe 1a) und der Bande 4 (Gruppe 1b/2) unterschieden werden.

Bei 50 % der Pherogramme waren 5 Banden optisch trennbar wahrzunehmen, bei den anderen 50 % waren nur 4 Banden, nämlich die LDH-Isoenzyme 2 - 5 sichtbar. Eine Relation zu der vorgenommenen Typisierung bestand dabei nicht.

2. Diagramme

In Analogie zu den pherographischen Ergebnissen stellten sich die entsprechenden Extinktionsmaxima und deren Relationen untereinander dar. Die Befunde lassen sich folgendermaßen gliedern:

<u>LDH:</u>	<u>Fälle:</u>
2 - 4	8
3	4
4	7
4 + 5	3

Tab. 2: LDH-Isoenzymverteilungstyp des Basalioms. Es werden der überwiegende Isoenzymtyp und die entsprechende Fallzahl angegeben.

Bei 8 Proben hoben sich die Fraktionen 2 - 4 eindeutig durch ihre weitaus größeren Ausschläge im Diagramm von den beiden anderen Fraktionen ab. In 4 Fällen überwog die mittlere Fraktion LDH 3 mit einem Extinktionsmaximum und entsprechend hohem Ausschlag im Diagramm, während die anderen Fraktionen bedeutend kleinere Ausschläge zeigten. Bei 7 Proben imponierte das Isoenzym 4 als stärkste Fraktion mit einem deutlich herausragenden Extinktionsmaximum und Diagramm-Gipfel, während die anderen Frak-

tionen schwächere Extinktionswerte aufwiesen. In 3 Fällen schließlich erwiesen sich LDH 4 und 5 als herausragende Fraktionen. Diese Resultate konnten nun unter dem Aspekt des Isoenzym mit der größten Extinktion und dem höchsten Ausschlag im Diagramm folgendermaßen aufgliedert werden:

LDH:	Fälle:
2 - 4	8 (3 x 3!) (5 x 4 !)
3	4
4	7
4 + 5	3 (3 x 4!)

Tab. 3: LDH-Verteilungstyp des Basalioms. Es sind das LDH-Muster, die Fallzahl und die Anzahl des mit einem Ausrufezeichen versehenen vorherrschenden Isoenzym angegeben.

Beim LDH-Verteilungstyp 2 - 4 waren 3 mal die LDH 3 und 5 mal die LDH 4 akzentuiert. Beim LDH-Verteilungstyp 4 + 5 war in allen 3 Fällen die LDH 4 betont.

Bei Summation dieser Aufteilung ergab sich folgendes Bild:

Die LDH 3 war bei insgesamt 7 Fällen (etwa 30 %), die LDH 4 bei insgesamt 15 Fällen (etwa 70 %) das Hauptisoenzym.

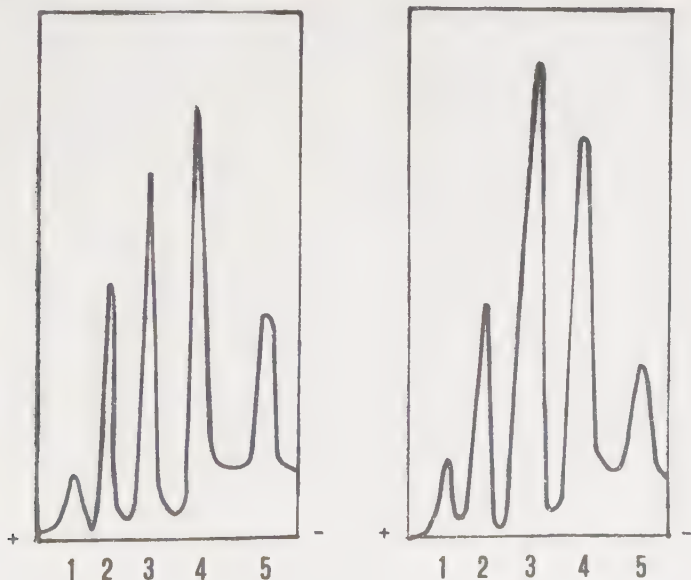


Abb. 2 und 3: Diagramme der LDH-Muster beim Basaliom. Innerhalb der Fraktionen 2 – 5 überwiegt die LDH 4 (linke Abb.) oder die LDH 3 (rechte Abb.)

C. Das LDH-Isoenzymogramm der seborrhoischen Warze

Die disk-elektrophoretischen Untersuchungen der Homogenate aus 22 exziierten Verrucae seborrhoicae ergaben folgende Ergebnisse:

1. Pherogramme

Nach der Dichte und Breite der sichtbaren Banden konnten 3 pherographische Typen unterschieden werden:

- (1) Die Fraktion 2 – 4 hebt sich als distinkte Bande deutlich ab (6 Fälle)
- (2) Die mittlere Bande, die LDH 3, ist am deutlichsten ausgebildet, während die anderen Barden schwächer sichtbar sind (13 Fälle).
- (3) Die Fraktion 4 hebt sich als stärkste Bande deutlich von den anderen ab (4 Fälle).

Die 1. Gruppe ließ sich dabei nach ihrer Hauptbande differenzieren in:

- (a) die Bande 2, (b) die Bande 3 weist die größte Dichte und Breite auf.

Bei Berücksichtigung der stärksten Bande konnten demzufolge 3 pherographische Typen unterschieden werden:

- (1) LDH 2 (Gruppe 1 a),
 - (2) LDH 3 (Gruppe 1 b und 2),
 - (3) LDH 4 (Gruppe 3)
- stellen jeweils die stärkste Bande dar.

In 75 % der Pherogramme waren 5, in 25 % 4 Banden erkennbar. Eine Korrelation zu der vorgenommenen Typisierung ließ sich nicht herstellen.

2. Diagramme

Die pherographischen Auswertungen konnten spektrophotometrisch bestätigt und präzisiert werden. Mit den Hauptbanden des Gel-Pherogramms korrelierte jeweils das Extinktionsmaximum und der stärkste Ausschlag im Diagramm. Danach ließen sich die Ergebnisse folgendermaßen rubrifizieren:

LDH:	Fälle:
2 - 4	6
3	13
4	3

Tab. 4: LDH-Verteilungstyp der seborrhoischen Warze. Es sind der festgestellte Isoenzymtyp und die entsprechende Anzahl der Proben angegeben.

Bei 6 Proben herrschten die Fraktionen 2 - 4 hinsichtlich Extinktionswert und Diagrammausschlag vor. In 13 Fällen war die LDH 3 dominierend und hob sich von den anderen Fraktionen deutlich ab. Bei 3 Proben zeigte sich eine Präferenz der LDH 4.

Nach den Extinktions- und diagrammatischen Ausschlagsmaxima ergab sich folgende Unterteilung:

LDH:	Fälle:
2 - 4	6 (2 x 2 !)
	(4 x 3 !)
3	13
4	3

Tab. 5: LDH-Verteilungstyp der seb. Warze. Neben LDH-Typ und entsprechender Fallzahl ist die dominierende Fraktion (mit einem Ausrufezeichen versehen) aufgeführt.

Innerhalb der Gruppe mit dem Intermediärtyp (LDH 2 - 4) waren 2 mal LDH 2 und 4 mal LDH 3 akzentuiert.

Diese Ergebnisse ergeben zusammenfassend:

Die stärkste Fraktion war in 2 Fällen (10 %) die LDH 2, in 17 Fällen (etwa 75 %) die LDH 3 und in 3 Fällen (etwa 15 %) die LDH 4.



Abb. 4

Diagramm des LDH-Musters der seb. Warze. Die LDH 3 stellt die größte Fraktion dar.

D. Das LDH-Isoenzymogramm des spinözellulären Karzinoms

Die zum Vergleich durchgeführten disk-elektrophoretischen Untersuchungen der Homogenate von 2 operierten spinözellulären Karzinomen zeigten pherographisch wie photospektrometrisch identische Ergebnisse:

In beiden Pherogrammen waren Bande 4 und 5 am stärksten sichtbar, während die 3 anderen Banden schwächer erkennbar waren. Analog zeigten LDH 4 und 5 die höchsten Extinktionswerte. Die Fraktion 4 wies jeweils das Extinktionsmaximum und im Diagramm den höchsten Ausschlag auf.

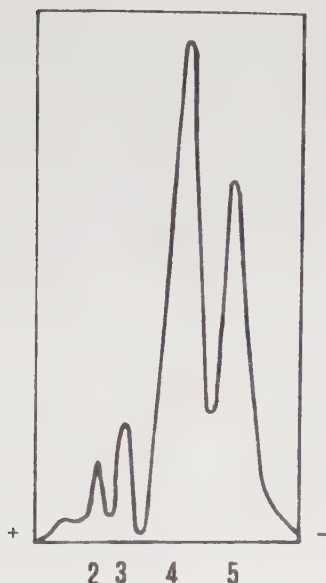


Abb. 5.:
Diagramm des LDH-Musters des spinözellulären Karzinoms. Innerhalb der Fraktionen 4 und 5 überwiegt die LDH 4.

E. Das LDH-Isoenzymogramm im Serum gesunder Probanden

Die disk-elektrophoretischen Untersuchungen der Seren von 5 gesunden Probanden ergaben folgende Ergebnisse:

1. Pherogramme

Die pherographischen Bilder wiesen eine deutliche Übereinstimmung im LDH-Muster auf. LDH 2 war die stärkste Bande, während die Fraktionen 1 und 3 annähernd gleiche Dichte und Breite besaßen. Bande 4 und 5 waren am schwächsten ausgebildet.

2. Diagramme

In Korrelation zu den pherographischen Ergebnissen wies die Fraktion 2 sowohl ein Extinktionsmaximum als auch den höchsten Ausschlag im Diagramm auf.

Die LDH 1 zeigt eine größere Extinktion und Ausschlagshöhe als die LDH 3. LDH 4 und 5 besaßen die geringste Aktivität (LDH 4 stärker als LDH 5).

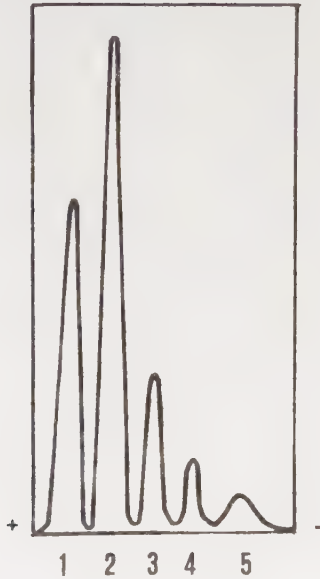


Abb. 6:

Diagramm des LDH-Musters im Serum gesunder Probanden. Innerhalb der Fraktionen 1 – 3 überwiegt die LDH 2.

F. Das LDH-Isoenzymogramm im Serum basaliomkranker Patienten

Die disk-elektrophoretischen Untersuchungen von 5 Seren basaliomkranker Patienten, die noch nicht operiert waren, ergaben folgende Ergebnisse:

1. Pherogramme

Auch hier imponierte im Pherogramm die Fraktion 2 als stärkste und dichteste Bande bei allen Proben. Schwächer ausgebildet waren die Banden 1 und 3. Bande 4 und 5 waren beide schwach ausgebildet.

2. Diagramme

Analog den photographischen Befunden zeigte das LDH-Isoenzym 2 ein Extinktionsmaximum und den höchsten Ausschlag im Diagramm.

In 3 Fällen ließ sich die LDH 1 als zweitstärkste Fraktion darstellen (LDH-Muster $2 > 1 > 3 > 4 > 5$). In 2 Fällen wiesen LDH 1 und 3 etwa gleich hohe Extinktionswerte und Diagrammausschläge auf (LDH-Muster $2 > 1 = 3 > 4 > 5$)

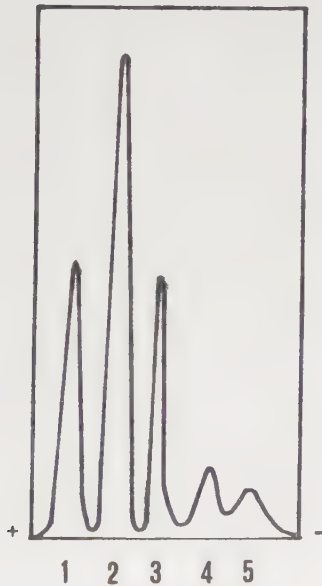


Abb. 7:

Diagramm des LDH-Musters im Serum basaliomkranker Patienten. Innerhalb der Fraktionen 1 - 3 überwiegt die LDH 2.

IV. Diskussion

Während mittlerweile zahlreiche Untersuchungsergebnisse über das LDH-Isoenzymogramm in verschiedenen Neoplasmen innerer Organe vorliegen, blieb bisher die Frage nach dem LDH-Muster und den metabolischen Verhältnissen in verschiedenen Hauttumoren im wesentlichen unbeantwortet. Das Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe der Polyacrylamid-Disk-Elektrophorese das LDH-Isoenzymogramm des Basalioms und der seborrhischen Warze zu untersuchen und es mit dem LDH-Muster der normalen Haut sowie des Serums gesunder Probanden und basaliomkranker Patienten zu vergleichen. Außerdem wurden zum Vergleich zwei spinözelluläre Karzinome untersucht. Eine gleichzeitige histologische Kontrolle sollte Fehldeutungen ausschließen und auf mögliche Korrelationen zwischen histologischen und isoenzymatischen Befunden hinweisen.

Auf diese Weise sollte experimentell Antwort auf verschiedene Fragen gegeben werden:

1. Besitzt das Basaliom ein charakteristisches LDH-Isoenzymmuster?
Welche metabolischen Verhältnisse herrschen in diesem Tumor vor?
2. Bestehen Korrelationen zwischen den histologischen und isoenzymographischen Ergebnissen beim Basaliom?
3. Besitzt die seborrhische Warze ein typisches Isoenzymmuster?
Welche metabolischen Verhältnisse bestehen in diesem Tumor?
4. Bestehen Korrelationen zwischen den histologischen und isoenzymatischen Befunden bei der seborrhischen Warze?
5. Weisen die LDH-Muster der seborrhischen Warze, des Basalioms und des spinözellulären Karzinoms signifikante Unterschiede auf? Läßt sich in diesem Fall daraus eine Differenzierungsmöglichkeit ableiten?
6. Lassen sich das LDH-Muster der gesunden Haut und das der tumorösen Haut voneinander differenzieren? Welche Schlüsse bezüglich des Metabolismus lassen sich ziehen?

7. Können anhand des LDH-Isoenzymogramms qualitative und quantitative enzymatische Unterschiede im Serum gesunder Probanden und basaliomkranker Patienten festgestellt werden? Bestehen also Differenzen bezüglich des isoenzymatischen Musters und der LDH-Aktivitäten?
8. Welche Relationen bestehen zwischen dem LDH-Muster der tumorösen Haut und dem dazugehörigen Serum? Können hieraus Aussagen über die Provenienz der einzelnen LDH-Isoenzyme der Haut abgeleitet werden?
9. In welcher Form lassen sich die gefundenen Resultate in den Rahmen anderer Untersuchungsergebnisse einordnen? Läßt sich unter Berücksichtigung der bisher vorliegenden Ergebnisse anderer Autoren über das LDH-Muster in benignen und malignen Neoplasmen eine Zuordnung der untersuchten Hauttumoren zu einem bestimmten Tumortyp auf der Basis isoenzymatischer Klassifizierung vornehmen?
10. Lassen sich altersabhängige Unterschiede im LDH-Muster und den LDH-Aktivitäten bei verschiedenen Altersgruppen des Patientengutes feststellen?

1. Die Frage nach einem einheitlichen LDH-Isoenzymmuster des Basalioms muß in dieser Form verneint werden. Es konnte jedoch eine Unterteilung in 2 Verteilungstypen getroffen werden: Beim 1. Typ, der in 19 Fällen (etwa 85 %) gefunden wurde, überwogen die intermediären Fraktionen 2 - 4, beim 2. Typ, der in 3 Fällen (etwa 15 %) gefunden wurde, die langsam wandernden Fraktionen 4 und 5.

Der 1. Typ ließ sich unter Berücksichtigung der Aktivitätsrelationen in 3 verschiedene Gruppen unterteilen:

Während sich in 8 Fällen die Fraktionen 2 - 4 annähernd gleich stark hervorhoben, prävalierten in 4 Fällen das Isoenzym 3 und in 7 Fällen das Isoenzym 4. Bei den 8 Fällen mit Prävalenz der Fraktionen 2 - 4 waren in 3 Fällen LDH 3 und in 5 Fällen LDH 4 akzentuiert.

Beim 2. Typ bildete jeweils die LDH 4 die stärkste Fraktion. Unter dem Aspekt der vorherrschenden Fraktion ergab sich somit ein etwas anderes Bild der Typisierung:

Während nur in 7 Fällen (etwa 30 %) das LDH-Isoenzym 3 dominierte, lag in 15 Fällen (etwa 70 %) eine Prävalenz der LDH 4 vor. Hieraus ergibt sich eine Tendenz zur Betonung der kathodennahen LDH 4.

WEBER und PFLEIDERER (211) fanden bei ihren Untersuchungen einen LDH-Verteilungstyp mit eindeutiger Prävalenz der Fraktion 5. Diese Ergebnisse können jedoch korrigiert werden, da die Autoren auch bei der Untersuchung der normalen Epidermis ein deutliches Überwiegen der LDH 5 beobachteten. Nach einer Untersuchung von MARGHESCU (122) überwiegt jedoch die LDH 4 in der normalen Epidermis. Danach ist anzunehmen, daß diese voneinander differierenden Angaben auf methodische Unterschiede zurückzuführen sind und die von WEBER und PFLEIDERER (211) als LDH 5 bezeichnete Fraktion mit der LDH 4 identisch ist, womit sich eine Übereinstimmung der Untersuchungsbefunde ergibt. Danach ist das Basaliom in die Reihe der Tumoren einzuordnen, deren Metabolismus sich vorwiegend über die anaerobe Glykolyse vollzieht.

Dieser Annahme entsprechen auch weitgehend die Befunde von BOHN und ROTHENBORG (250), welche beim Basaliom einen Verteilungstyp mit Überwiegen der LDH-Isoenzyme 3 - 5 bei Betonung der Fraktionen 3 und 4 fanden.

2. Zwischen den histologischen Befunden und den entsprechenden LDH-Mustern konnten beim Basaliom keine Korrelationen hergestellt werden. Es ließen sich keine der aufgeführten Verteilungstypen einem bestimmten histologischen Bild zuordnen. Zur Untersuchung kamen dabei die histologischen Typen des soliden, zystischen und adenoiden Basalioms, die jeweils mit verschiedenen Isoenzymmustern einhergingen, ohne daß sich eine gerichtete Tendenz zu einem bevorzugten isoenzymatischen Typ erkennen ließ. Eine Beziehung analog zu den Befunden einiger Autoren (74, 108, 222, 239), daß entdifferenzierte Tumoren wie die soliden Tumoren in ihrem LDH-Muster mehr zum Indifferenztyp (LDH 2 - 4) und mehr differenzierte Tumoren wie z. B. das Adenokarzinom mehr zu einem Muster mit Betonung der anaeroben Isoenzyme (LDH 4 und 5) neigen, ließ sich ebenfalls nicht bei den verschie-

denen histologischen Differenzierungstypen des Basalioms nachweisen.

3. Bei der Verruca seborrhoica (Synonyma: Verruca pigmentosa, Verruca senilis, pigmento-hyperkeratotisches Epitheliom BLOCH) fanden sich in allen untersuchten Fällen der Verteilungstyp LDH 2 - 4. Dieser ließ sich jedoch wiederum nach den Aktivitätsrelationen in 3 Gruppen gliedern: Während in 6 Fällen die Fraktionen 2 - 4 deutlich betont waren, imponierten in 13 Fällen die LDH 3 und in 3 Fällen die LDH 4. Bei den 6 Fällen mit einem Indifferenztyp waren in 2 Fällen die LDH 2 und in 4 Fällen die LDH 3 akzentuiert.

Unter dem Aspekt der vorherrschenden Fraktion ergab sich somit, daß in 2 Fällen (etwa 10 %) die LDH 2, in 17 Fällen (75 %) die LDH 3 und in 3 Fällen (etwa 15 %) die LDH 4 überwogen. Es bestand also eine Tendenz zur Betonung des Isoenzym 3.

Bei der seborrhoischen Warze dürften also metabolische Verhältnisse vorliegen, die denen der meisten inneren Organe entsprechen. Andere Untersuchungsergebnisse über das LDH-Muster der seborrhoischen Warze liegen bisher noch nicht vor.

4. Auch bei der seborrhoischen Warze ergaben sich zwischen den histologischen Befunden und den entsprechenden Isoenzymmustern keine Zusammenhänge. Es ließen sich keine der ermittelten LDH-Verteilungstypen einem bestimmten histologischen Typ zuordnen. Hyperkeratotischer und pigmentierter Typ der Verruca seborrhoica wiesen jeweils verschiedene LDH-Muster auf, ohne daß eine gerichtete Tendenz gefunden werden konnte.

5. Unter dem Aspekt der LDH-Verteilungstypen können seborrhoische Warze und Basaliom, die in der überwiegenden Zahl der Fälle - bis auf 3 Ausnahmen beim Basaliom - den sogenannten Indifferenztyp mit den Fraktionen 2 - 4 aufwiesen, dem spinozellulären Karzinom gegenübergestellt werden, da dieses in beiden untersuchten Fällen den Verteilungstyp 4 und 5 besaß.

Da die Hauttumoren mit dem Indifferenztyp 2 - 4 in der Weise differenziert werden konnten, daß bei der seborrhischen Warze hauptsächlich die LDH 3 und beim Basaliom hauptsächlich die LDH 4 ein Aktivitätsmaximum zeigte, läßt sich - unter Einschränkung der geringen Fallzahl spinozellulärer Karzinome - eine Korrelation zwischen Tumordignität und isoenzymatischem Muster herstellen. Während bei der benignen Verruca seborrhica die intermediäre Fraktion 3 dominierte, fand sich beim Basaliom und im spinozellulären Karzinom eine Tendenz zu den Fraktionen der anaeroben Glykolyse.

Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse ist es wahrscheinlich, daß der Stoffwechsel des Basalioms eine Übergangsstellung zwischen normalem und mehr anaerobem Metabolismus einnimmt, während das spinozelluläre Karzinom vorwiegend unter anaeroben Bedingungen arbeitet. Analog der klinischen Klassifizierung in benigne (seborrhische Warze), sogenannte semimaligne (Basaliom) und maligne (spinozelluläres Karzinom) Tumoren läßt sich somit zwischen Tumoren mit Prävalenz der intermediären Fraktionen 2 - 4 und einem Aktivitätsmaximum der LDH 3 (seborrhische Warze), Tumoren mit Prävalenz der intermediären Fraktion und einem Aktivitätsmaximum der LDH 4 (Basaliom) sowie Tumoren mit Prävalenz der langsamen Fraktionen 4 und 5 und einem Aktivitätsmaximum der LDH 4 (spinozelluläres Karzinom) unterscheiden. Es muß jedoch nochmals betont werden, daß die Relevanz dieser Aussage durch die geringe Fallzahl, besonders der spinozellulären Karzinome, eingeschränkt ist.

6. Eine qualitative Differenzierung zwischen gesunder Haut einerseits und seborrhischer Warze, Basaliom und spinozellulärem Karzinom andererseits läßt sich mit der LDH-Isoenzymographie nicht durchführen, da sowohl in der gesunden Haut wie auch beim Basaliom (zumindest in 70 % der untersuchten Fälle) und dem Spinozellulären Karzinom ein LDH-Verteilungsmuster mit Präferenz des LDH-Isoenzyms 4 vorliegt. Davon lassen sich das LDH-Verteilungsmuster der seborrhischen Warze und eines Teils der un-

tersuchten Basaliome (30 %) mit einem Aktivitätsmaximum der LDH 3 abgrenzen.

Auch unter Berücksichtigung des differenzierten Verteilungstypes mit den Aktivitätsrelationen der einzelnen Fraktionen untereinander ergibt sich nur bedingt eine Abgrenzungsmöglichkeit.

Während die gesunde Haut stets ein Isoenzymogramm mit den Aktivitätsrelationen LDH 4 : 3 : 2 aufweist und vom Basaliom, für welches auf Grund der verschiedenen Verteilungsmuster kein typisches LDH-Isoenzymogramm aufgestellt werden kann, nicht sicher abzugrenzen ist, lassen sich die LDH-Muster der gesunden Haut, der seborrhischen Warze und des spinozellulären Karzinoms voneinander trennen:

Dem Verteilungstyp LDH 4 : 3 : 2 der gesunden Haut stehen das LDH-Muster der seborrhischen Warze (in 75 % der Fälle LDH 3 : 4 : 2, bzw. LDH 3 : 2 : 4, in 10 % LDH 2 : 3, bzw. LDH 2 : 4 und in 15 % LDH 4 : 3, bzw. LDH 4 : 2) und das des spinozellulären Karzinoms (in beiden Fällen LDH 4 : 5) gegenüber.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, daß das Basaliom auf Grund der Verschiedenheit seiner LDH-Muster nicht generell von der gesunden Haut isoenzymatisch abgrenzbar ist. 30 % der untersuchten Fälle der Basaliome ließen sich durch die Prävalenz der LDH 3 vom Verteilungstyp der gesunden Haut trennen. Bei den anderen 70 % der untersuchten Fälle von Basaliomen dominierte wie bei der gesunden Haut die LDH 4. Diese 70 % ließen sich dahingehend differenzieren, daß zwar bei fast allen Fällen dieses Verteilungstypes die LDH 3 die zweitstärkste Fraktion darstellte, aber in 60 % dieses Types die LDH 5 und nur in 40 % die LDH 2 (wie bei der gesunden Haut) die drittstärkste Aktivität besaß. Für die seborrhische Warze und das spinozelluläre Karzinom dagegen ergibt sich eine relativ gute Unterscheidungsmöglichkeit durch ihr – im Vergleich zur gesunden Haut und untereinander – differentes LDH-Muster.

Zusätzlich wurde noch der Frage nachgegangen, ob einerseits Basaliome, welche stärkere Ulzerationen, Destruktionen und invasives Wachstum zeigten, eher mit einer Neigung zu den glykolytischen Isoenzymen unter Betonung

der LDH 4 einhergingen, und andererseits Basaliome, welche klinisch und histologisch eher blande verliefen, eine Neigung zu den intermediären Fraktionen 2 - 4 unter Betonung der LDH 3 aufwiesen. Es konnten jedoch auch unter Berücksichtigung dieser klinischen und histologischen Kriterien keine Korrelationen gefunden werden.

Aus den besprochenen Befunden ergibt sich, daß die malignen Tumoren (Basaliom, spinözelluläres Karzinom) ihre Energiegewinnung vorwiegend unter anaeroben Bedingungen vollziehen, während die benignen Tumoren (seborrhoische Warze) die gleichen metabolischen Verhältnisse wie die meisten anderen Organe und Gewebe besitzen.

7. Die Untersuchung von Seren hautgesunder Probanden und basaliomkranker Patienten ergab keinen wesentlichen Unterschied im LDH-Verteilungstyp. Beide Kollektive wiesen einen Verteilungstyp mit Überwiegen der oxidativen Isoenzyme (LDH 1 und 2) auf. Geringe Differenzen ergaben sich nur bei der Differenzierung der anderen Fraktionen. Während alle 5 Seren gesunder Probanden das LDH-Muster $2 > 1 > 3 > 4 > 5$ hatten, fand sich unter den 5 Seren basaliomkranker Patienten 3 mal eben dieses Muster und 2 mal das LDH-Muster $2 > 1 = 4 > 5$.

Da bei Patienten mit Malignomen häufig eine erhöhte Gesamt-LDH im Serum (SLDH) gefunden wurde (16, 25, 36, 57, 63, 80 - 82, 107, 158, 222, 230, 232, 242, 247, 248), verglichen wir neben den qualitativen LDH-Mustern auch die quantitativen LDH-Aktivitätsrelationen im Serum der gesunden Probanden und der basaliomkranken Patienten. Es fand sich kein signifikanter Unterschied, so daß die Frage nach möglichen Unterschieden der Gesamt-SLDH und nach quantitativen Unterschieden der einzelnen Fraktionen bei gleichem LDH-Muster beider Kollektive verneint werden muß. Möglicherweise sind für die genaue Erfassung differenter Aktivitäten bei gleichem LDH-Muster für verschiedene Kollektive jedoch andere Methoden, wie z. B. die radioimmunologischen (28), geeigneter.

Die Inkongruenz der LDH-Muster im Serum und im Gewebe beim Basaliom dürfte in den unterschiedlichen Eliminationskonstanten der einzelnen LDH-

Isoenzyme begründet sein (23, 41, 64). Mittels intravenös injizierter LDH-Isoenzyme konnte in Tierversuchen an Schafen nachgewiesen werden, daß die LDH 5 bedeutend schneller als die LDH 1 aus dem Blut eliminiert wird (23). Für die LDH 1 wurde eine biologische Halbwertszeit von 48 Std., für die LDH 5 von 8 Std. ermittelt (23, 41). Die unterschiedlichen Eliminationskonstanten erklären auch die Tatsache, daß einerseits eine Divergenz der LDH-Muster im Tumor und im Serum tumorkranker Patienten und andererseits eine Kongruenz der Serum-LDH-Muster und der für das befallene Organ typischen LDH-Muster bei parenchymatösen Erkrankungen besteht. Bei den parenchymatösen Erkrankungen wie dem Herzinfarkt und der akuten Virushepatitis wirkt sich dieser differente Eliminationsmechanismus der einzelnen LDH-Isoenzyme nicht aus, weil das organtypische LDH-Muster innerhalb kurzer Zeit in die Blutbahn gelangt (108). Bei mit dem akuten Krankheitsgeschehen zeitgleicher Bestimmung des Isoenzymbildes kommen daher die unterschiedlichen Eliminationsgeschwindigkeiten nicht zum Tragen. Demgegenüber resultiert die erhöhte SLDH bei Tumorkranken aus einer kontinuierlichen und langsameren Abgabe der LDH-Isoenzyme aus dem Tumorgewebe in die Blutbahn. Deswegen kommt es bei Neoplasmen mit den LDH-Mustern 3 - 5 und 4 - 5 im Serum zu einer längeren Persistenz und somit Prävalenz der Isoenzyme mit langsameren Eliminationsgeschwindigkeiten, welche bei den Tumoren mit den vorherrschenden LDH-Mustern 2 - 4 und 1 + 2 bereits von vornherein vermehrt vom Tumor in das Serum gelangen.

8. Während im Serum basaliomkranker Patienten wie bei gesunden Probanden die Fraktionen 1 und 2 bei Prävalenz der LDH 2 vorherrschten, überwiegen im Basaliomgewebe die intermediären Isoenzyme 3 und 4. Da sich keine Korrelation zwischen Gewebe-LDH-Muster und histologischem Bild ergab (speziell interessierte dabei die Frage, ob sich zwischen dem Grad der Vaskularisation des Basaliomareals und dem entsprechenden LDH-Muster eine Beziehung im Sinne einer Annäherung des LDH-Musters des Basalioms an das serumeigene LDH-Bild bei stärkerer Vaskularisation herstellen ließe), liegt es nahe, eine autochthone Provenienz der LDH beim Basaliom

zu postulieren bzw. die autochthone LDH bei möglicher Interferenz mit der serogenen LDH für den gewebeeigenen LDH-Verteilungstyp verantwortlich zu machen.

Die Frage, ob die Relation zwischen gesundem und tumorös alteriertem Gewebeanteil im Basaliom das LDH-Muster des Basalioms beeinflusst, muß ebenfalls auf Grund der fehlenden Korrelation zwischen histologischem Befund und entsprechendem LDH-Muster des Gewebes verneint werden. Allerdings muß einschränkend darauf hingewiesen werden, daß der jeweilige histologische Schnitt nicht für das gesamte Exzidat repräsentativ sein muß. Die vorliegenden Befunde machen wahrscheinlich, daß die Laktatdehydrogenasen des Basaliomexzidates heterogener Herkunft sind und durch die Interferenz der LDH hautgesunder und basaliomatöser Gewebeanteile gebildet werden, und daß die LDH-Muster, die von dem Muster der gesunden Haut differieren, vorwiegend durch die LDH des basaliomatös alterierten Gewebes bestimmt werden, während sich die LDH-Muster, die dem Muster der gesunden Haut gleichen, aus den Laktatdehydrogenasen der gesunden und kranken Hautbezirke zusammensetzen.

Offen bleibt die Frage, ob es Basaliome mit stärkerem und schwächerem Sauerstoffverbrauch im Gewebestoffwechsel und konsekutiv verschiedenen LDH-Mustern gibt. Es ist denkbar, daß sich nur die Basaliome in ihrem isoenzymographischen Bild von dem der gesunden Haut trennen lassen, die einen stärkeren anaeroben Stoffwechsel besitzen, während Basaliome mit vorwiegend oxydativem Stoffwechsel isoenzymatisch nicht von der gesunden Haut zu trennen sind.

9. Es wurden bei den bisherigen Untersuchungen über das isoenzymographische LDH-Bild verschiedenster viszeraler Neoplasmen mehrere Verteilungstypen gefunden, die sich unter Berücksichtigung der stärksten Fraktion im LDH-Muster in die Verteilungstypen mit Betonung der LDH 1 + 2, 2 - 4, 3 + 4, 3 - 5, 4 + 5 einteilen lassen.

Es wurde nur eine geringe Anzahl von Neoplasmen mit einem eindeutig auf einen oxydativen Metabolismus hinweisenden Isoenzymmuster gefunden, wo-

bei es sich vorwiegend um Bronchial-Karzinome handelte (71, 108, 146). Bei der Gruppe der malignen Tumoren, welche mit einem Indifferenztyp einhergeht, also einem LDH-Muster mit Überwiegen der intermediären Fraktionen 2 - 4 (9, 54, 68, 71, 84, 108, 155, 201, 221, 222, 239), fiel bei einigen Untersuchungen ein Vorherrschen solider Karzinome auf (71, 108, 201, 239). Dieser Befund läßt sich mit den Ergebnissen von PFLEIDERER und WACHSMUTH (155) vereinbaren, die bei vielen Organen im Frühstadium ihrer Organogenese eine Prävalenz von LDH 3 fanden. Es besteht also eine Analogie der enzymatischen bzw. metabolischen Verhältnisse zwischen weitgehend entdifferenzierten Tumoren und noch vorwiegend undifferenzierten embryonalen Organgewebe (155, 156, 201). Diese Feststellung trifft allerdings nur auf maligne Tumoren zu, während benigne Tumoren und Normalgewebe darin nicht einbezogen werden können.

Nach den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen muß das Basaliom zwischen die Gruppe mit einem Indifferenztyp und die Gruppe mit Prävalenz der LDH 3 und 4 eingereiht werden. Zwar fanden sich bei photographischer Aufteilung in 19 von 22 Fällen der untersuchten Basaliome ein Überwiegen der Fraktionen 2 - 4, jedoch ergab deren Aufschlüsselung nach der Fraktion mit der stärksten Aktivität in allen Fällen eine Betonung der LDH 3 oder 4. Bei Auswertung des ganzen Kollektivs, also inklusive der 3 Fälle mit einem Verteilungstyp LDH 4 + 5, hinsichtlich der stärksten Aktivitäten fand sich in 7 Fällen (70 %) ein Maximum bei der LDH 4, so daß das Basaliom zwar eine Zwischenstellung einnimmt, aber doch mehr der nächsten Gruppe mit Prävalenz der LDH 3 + 4 zuzurechnen ist, was auch mit dem histologischen Differenzierungsgrad in Einklang steht.

Histologisch-organogenetisch kann das Basaliom als ein von den den fetalen Zellen ähnlichen Zellen des Stratum basale (oder der Follikel) ausgehender Tumor gekennzeichnet werden, dessen basaloide Zellen einen basophilen, relativ großen Kern und einen großen Nucleolus sowie zahlreiche Mitosen aufweisen und als unreife pluripotente Zellen somit einen organoiden Tumor bilden.

Der Verteilungstyp LDH 3 + 4 wurde in einigen Fällen bei noch deutlich differenzierten malignen Tumoren gefunden (71, 222). In diese Gruppe also

muß nach den angeführten Erwägungen das Basaliom weitgehend eingereiht werden.

Der Großteil der bisher durchgeführten Untersuchungen über das LDH-Muster bei malignen Neoplasmen ergab einen Trend zu den Isoenzymen des anaeroben Metabolismus (9, 11, 42, 43, 65, 66, 68, 71, 107, 108, 110, 116, 144, 155, 164, 181, 193, 194, 198, 200, 221). Hierbei ergaben sich zwischen der Gruppe maligner Tumoren mit einem LDH-Muster 3 + 5 und der mit einem LDH-Muster 4 + 5 keine auffälligen Unterschiede hinsichtlich klinischer und histologischer Befunde. Auffallend war bei diesen Gruppen jedoch ein Überwiegen differenzierter Karzinome mit einem relativ hohen Anteil von Adenokarzinomen (71). Da sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen ergaben, ist es wohl sinnvoll, sie zu einer Gruppe zusammenzufassen, in der die LDH-Isoenzyme der eigentlichen Glykolyse Aktivitätsmaxima aufweisen. In dieser Gruppe sind also auch die beiden hier untersuchten Fälle von spinözellulärem Karzinom mit einem LDH-Muster 4 + 5 einzuordnen. 3 Fälle von Basaliomen des untersuchten Kollektivs besaßen ebenfalls dieses Muster, ohne daß sie sich histologisch besonders von den anderen untersuchten Basaliomen unterscheiden ließen. Über die Ursache dieser Differenz lassen sich noch keine Aussagen machen. Die aufgeführten Befunde lassen sich dahingehend zusammenfassen, daß die differenten LDH-Muster von Malignomen Ausdruck unterschiedlicher Stoffwechselvorgänge in den betreffenden Tumoren sind und teilweise eine Korrelation zu ihrem histologischen Differenzierungsgrad aufweisen (74, 155). Diese Folgerung wurde jedoch auch schon bezweifelt (90).

Bisher ist es nur in vereinzelten Fällen gelungen, mittels des LDH-Isoenzymogramms zwischen benignen und malignen Tumoren eines Organs unterscheiden zu können, und zwar bei Tumoren der Mamma (11, 200), der Prostata (43, 54), des Gehirns (66), des Uterus (146) und der Niere (193, 194). Vergleichende Untersuchungen im Tierexperiment und an Zellkulturen zwischen benignem und malignem Tumorgewebe ergaben ebenfalls ein Ansteigen der glykolytischen Aktivität in malignen Neoplasmen bzw. Zell-

kulturen (29, 71, 92).

Die hier aufgeführten Ergebnisse anderer Autoren stimmen mit unseren Befunden weitgehend überein:

Als benignen Tumor besitzt die seborrhische Warze ein LDH-Muster mit Vorherrschen der LDH 3, und als maligne Tumoren weisen Basaliom und spinozelluläres Karzinom eine Tendenz zu den glykolytischen Isoenzymen in ihrem LDH-Muster auf.

10. Die Aufteilung unseres Patientengutes nach Altersgruppen unter 50, 50 - 60, 60 - 70 und über 70 Lebensjahren ergab beim Basaliom eine Fallverteilung von 2 - 5 - 10 - 5 und bei der seborrhischen Warze von 2 - 6 - 11 - 3. Hierbei konnten weder für das Basaliom noch für die Verruca seborrhica klare Unterschiede im LDH-Muster und den LDH-Aktivitäten zwischen den verschiedenen Altersgruppen festgestellt werden. Die bei tierexperimentellen Untersuchungen über die Alterabhängigkeit der Laktatdehydrogenasen gewonnenen Befunde, daß die Gesamtaktivität der LDH mit zunehmendem Alter abnimmt, wobei die LDH 3 und 4 mit zunehmendem Alter kontinuierlich ansteigen und die LDH 1 und 2 stark abfallen, während die LDH 5 kein einheitliches Verhalten erkennen läßt (58), dürften sich auch nur bei Kollektiven mit größerem Altersunterschied bemerkbar machen. In unserem Fall handelte es sich um eine in etwa geschlossene Altersgruppe, die in sich keine erkennbaren altersabhängigen Veränderungen aufweist.

V. Zusammenfassung

Mit Hilfe der Polyacrylamid-Disk-Elektrophorese wurden die Gewebe-LDH-Isoenzyemmuster von 22 Basaliomen, 22 seborrhischen Warzen und 5 gesunden Hautproben sowie die Serum-LDH-Muster von 5 basaliomkranken Patienten und 5 gesunden Probanden untersucht. Außerdem gelangten 2 Fälle von spinözellulärem Karzinom zur Untersuchung.

Neben der Frage nach tumortypischen LDH-Verteilungstypen dieser Hauttumoren sollte geklärt werden, ob beim Basaliom und der seborrhischen Warze zwischen histologischem und isoenzymatischem Befund Korrelationen bestehen. Außerdem wurde untersucht, ob sich einerseits gesunde und tumoröse Haut und andererseits tumoröse Haut und die Seren der entsprechenden Patienten mittels dieses Verfahrens deutlich abgrenzen lassen. Schließlich sollten von den gewonnenen LDH-Mustern Rückschlüsse auf den Metabolismus dieser Neoplasien gezogen werden.

Das Basaliom zeigte kein einheitliches LDH-Muster. Es dominierten beim Basaliom die LDH 3 und 4, bei der seborrhischen Warze die LDH 3, in der gesunden Haut die LDH 4 und beim spinözellulären Karzinom die LDH 4 und 5. Die Serum-Muster der LDH waren bei den basaliomkranken Patienten und den gesunden Probanden gleich, wobei die LDH 2 vorherrschte. Die differierten LDH-Muster im Gewebe und Serum beim Basaliom wurden auf die unterschiedlichen Eliminationskonstanten für die einzelnen Laktat-Dehydrogenasen zurückgeführt. Zwischen histologischem Befund und LDH-Muster fand sich weder beim Basaliom noch bei der seborrhischen Warze eine eindeutige Korrelation. Nach diesen Befunden kann mittels der disk-elektrophoretisch gewonnenen LDH-Isoenzyemogramme nicht generell zwischen gesunder und neoplastisch alterierter Haut differenziert werden. Eine Verschiebung zu den langsam wandernden Laktat-Dehydrogenasen im Isoenzyemogramm sowie eine Aktivitätszunahme dieser Isoenzyme der anaeroben Glykolyse (LDH 4 + 5) spricht jedoch für eine Malignität der Neoplasie.

VI. Literaturverzeichnis

- 1) ADELMANN, B., H. MARQUARDT, K. KÜHN: Investigations on non-collagenous proteins in ratskin
Biochem. Z. 346, 282 (1966)
- 2) AGOSTONI, A., C. VERGANI, L. VILLA: Intracellular distribution of the different forms of lactic dehydrogenase
Nature (London) 209, 1024 (1966)
- 3) ALLEN, J. M.: Multiple forms of lactic dehydrogenases in tissues of the mouse, their specificity and responses to altered physiological conditions
Ann. N.Y. Acad. Sci. 94, 937 (1961)
- 4) ALLRED, R. J., H. J. KEUTEL: Microslide acrylamide gel electrophoresis technique for tissue lactic dehydrogenase
J. Lab. clin. Med. 71, 179, (1968)
- 5) APPELLA, E., C. L. MARKERT: Dissociation of lactate dehydrogenase into subunits with guanidine hydrochloride
Biochem. biophys. Res. Commun. 6, 171 (1961)
- 6) von ARDENNE, M.: Die in-vivo-Größe der aeroben Glykolyse als Hauptparameter des Stoffwechselunterschiedes zwischen Normalzellen und Krebszellen
Klin. Wschr. 48, 1397 (1970)
- 7) BABSON, A. L.: The clinical differentiation of tissue lactic dehydrogenase
Clin. chim. Acta 16, 121 (1966)
- 8) BADEN, H. P., I. M. FREEDBERG: Studies of epidermal protein metabolism. II. Soluble epidermal proteins
J. invest. Derm. 39, 401 (1962)

- 9) BÄR, U., E. SCHMIDT, F.W. SCHMIDT: Enzymmuster und Isoenzyme menschlicher Tumoren
Klin. Wschr. 41 , 977 (1963)
- 10) BARNETT, H.: The staining of lactic dehydrogenase isoenzymes after electrophoretic separation on cellulose acetate
J. clin. Path. 17 , 567 (1964)
- 11) BARNETT, H., A. GIBSON: Lactate dehydrogenase isoenzyme patterns in carcinomas of the breast
J. clin. Path. 17 , 201 (1964)
- 12) BEAUTYMAN, W.: Dehydrogenase isoenzymes
Lancet II, 305 (1962)
- 13) BECKER, C., G.S. BEAUDREAU, J.W. BEARD: Glucose und lactate utilization by Myeloblasts and Erythroblast of Avian Viral Leukemias
J. nat. Cancer Inst. 23 , 261 (1959)
- 14) BECKMANN, L.: Isozyme Variations in man.
Monographs in Human Genetics, Bd. I., Karger, Basel 1966
- 15) BIEL, H., N. HEIMBURGER, D. KRAFT, T. KRANZ, R. SCHMIDT-BERGER: Einige neuere analytische Methoden zur Charakterisierung der Plasmaproteine
Behringwerk-Mitteilung (Marburg) 43 , 3 (1964)
- 16) BIERMAN, H.R., B.R. HILL, L. REINHARDT, E. EMORY: Correlation of serum lactic dehydrogenase activity with the clinical status of patients with cancer, lymphomas and leukemias
Cancer Res. 17 , 660 (1957)
- 17) BLANCHAER, M.C.: Electrophoresis of serum lactic dehydrogenase
Clin. chim. Acta 6 , 272 (1961)

- 18) BLANCO, A., W.H. ZINKHAM: Lactate dehydrogenases in human testes
Science 139 , 601 (1963)
- 19) BLATT, W.F., J. WALKER, M. MAGER: Tissue lactate dehydrogenase isoenzymes: Variation in rats during prolonged cold exposure
Amer. J. Physiol. 209 , 785 (1965)
- 20) BONTING, S.L., I.M. ROSENTHAL: Effects of the method of tissue preparation on the assay of tissue enzyme activities
Nature (London) 185 , 686 (1960)
- 21) BOTTOMLEY, R.H., S.L. LOCKE, H.C. INGRAM: Lactic dehydrogenase of human chronic lymphocytic leukemic leukocytes
Blood 27 , 85 (1966)
- 22) BOXER, G.E., T.M. DEVLIN: Pathways of intracellular hydrogen transport
Science 134 , 1495 (1961)
- 23) BOYD, J.W.: The rates of disappearance of L-Lactate dehydrogenase isoenzymes from plasma
Biochem. biophys. Acta (Amst.) 132 , 221 (1967)
- 24) BRAND, L., J. EVERSE, N.O KAPLAN: Structural characteristics of dehydrogenases
Biochemistry 1 , 423 (1962)
- 25) BRINDLEY, C.O., F.L. FRANCIS: Serum lactic dehydrogenase and glutamic-oxaloacetic transaminase correlations with measurements of tumor masses during therapy
Cancer Res. 23 , 112 (1963)
- 26) BRODY, I.A.: Isozyme histochemistry: A new method for the display of selective lactic dehydrogenase
Nature (London) 201 , 685 (1964)

- 27) BURD, J.F., M. USATEGUI-GOMEZ: A colorimetric assay for serum lactate dehydrogenase
Clin. chim. Acta 46 , 223 (1973)
- 28) BURD, J.F., M. USATEGUI-GOMEZ, A. FERNANDEZ DE CASTRO, N.S. MHATRE, F.M. YEAGER: Immunochemical studies on lactate dehydrogenase: preparation and characterisation of anti-M lactate dehydrogenase antiserum: development of an immunochemical assay for lactate dehydrogenase isoenzymes in human serum
Clin. chim. Acta 46 , 205 (1973)
- 29) BURGESS, E.A., B. SYLVEN: Lactic dehydrogenase activity in plasma and interstitial fluid during growth of mouse tumors
Cancer Res. 23 , 714 (1963)
- 30) CAHN, R.D., N.O. KAPLAN, L. LEVINE, E. ZWILLING: Nature and development of lactic dehydrogenases
Science 136 , 962 (1962)
- 31) CAHN, R.D.: Cellular damage and the control of lactic dehydrogenase synthesis in cell cultures by oxidative metabolites
J. cell. Biol. 19 , 12 A (1963)
- 32) CARR, A., A.W. SKILLEN: Lactate dehydrogenase isoenzymes in the skin
Brit. J. Derm. 75 , 331 (1963)
- 33) CHILDS, B.,V.M. DER KALOVSTIAN: Genetic heterogeneity
New Engl. J. Med. 279 , 1205 (1968)
- 34) CHURY, Z., J. TOVAREK, J. VOJTKOVA: Isoenzyme von Laktat-Dehydrogenase im Sternalmark und Venenblutserum bei inneren Erkrankungen
Z. Klin. Chem. 6 , 92 (1968)

- 35) COHEN, L., J. DJORDJEVICH, S. JACOBSEN: Sex related differences in isozymes of serum lactic dehydrogenase
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 126 , 55 (1967)
- 36) CRISPENS, C.G.: Serum lactic dehydrogenase levels in mice during the development of antiochthonous and chemically induced tumors
J. nat. Cancer Inst. 30 , 361 (1963)
- 37) CRUICKSHANK, C.N.D.: Metabolic processes in skin
Brit. J. Derm. 77 , 603 (1965)
- 38) DAVIDSON, R.G., R.A. FILDES, A.M. GLEN-BOTT, H. HARRIS, E.B. ROBSON, T.E. CLEGHOVN: Genetical studies on an variant of human lactate dehydrogenase (Subunit A)
Ann. hum. Genet. 29 , 5 (1965)
- 39) DAVIS, B.J.: Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins
Ann. N.Y. Acad. Sci. 121 , 404 (1964)
- 40) DAWSON, D.M., T.L. GOODFRIEND, N.O. KAPLAN: Lactic dehydrogenases: Functions of the two types.
Science 143 , 929 (1964)
- 41) DAWSON, D.M., C.A. ALPER, J. SEIDMAN, J. MENDELSON: Measurement of serum enzyme turnover rates
Ann. intern. Med. 70 , 799 (1969)
- 42) DELBRÜCK, A., H. SCHIMASSEK, K. BARTSCH, T. BÜCHER: Enzym-Verteilungsmuster in einigen Organen und in experimentellen Tumoren der Ratte und der Maus
Biochem. Z. 331 , 297 (1959)

- 43) DENIS, L. J., G.R. PROUT, K.VAN CAMP, A. VAN SANDE:
Electrophoretic characterisation of the prostata.
I. Proteins and lactic dehydrogenase in benign hyperplasia
and carcinoma
J. Urol. (Baltimore) 88, 77 (1962)
- 44) DIETZ, A.A., T. LUBRANO: Separation and quantitation of
LDH isoenzymes by disc gel electrophoresis
Analyt. Biochem. 20, 240 (1967)
- 45) DIETZ, A.A., T. LUBRANO, H.M. RUBINSTEIN: Disc
electrophoresis of lactate dehydrogenase isoenzymes
Clin. chim. Acta 27, 225 (1970)
- 46) DIOGUARDI, N., A. AGOSTONI, G. FIORELLI, B. LOMANTO:
Characterisation of lactic dehydrogenase of normal human
granulocytes
J. Lab. clin. Med. 61, 713 (1963)
- 47) DIOGUARDI, N., A. AGOSTONI, G. FIORELLI, P.M. MANNUCCI:
Characteristics of lactic dehydrogenase in human erythrocytes
Enzym. biol. clin. 4, 31 (1964)
- 48) DIOGUARDI, N., A. AGOSTONI: Multiple Molekularformen der
Laktatdehydrogenase normaler und leukaemischer menschlicher
Lymphozyten
Enzym. biol. clin. 5, 3 (1965)
- 49) DOHR, H., R.M. HERRANZ: Mengenunterschiede in den Mitochon-
drienfraktionen von Hirntumoren und normalem Hirngewebe.
Klin. Wschr. 42, 244 (1964)
- 50) DÖLKEN, G., K. SCHUMACHER, W. KÜBLER, W. SCHNEIDER,
R. GROSS: Die Beziehungen enzymkinetischer Eigenschaften der
LDH-Isoenzyme des Herzens zum Zellstoffwechsel
Verh. dtsh. Ges. inn. Med. 77, 164 (1971)

- 51) DORFMAN, L. E., E. AMADOR, W.E.C. WACKER: Urinary lactic dehydrogenase activity. II. Elevated activities for the diagnosis of carcinoma of the kidney and the bladder Biochem. Clin. 2 , 41 (1963)
- 52) DUBACH, U.C., D. VARIAKOJIS: Diagnostische Bedeutung der Lactatdehydrogenase-Isoenzyme (mit der Hitzeinaktivierungsmethode) Schweiz. med. Wschr. 93 , 1224 (1963)
- 53) DUBACH, U.A.: Diagnostischer Wert von Enzymbestimmungen im Urin bei Tumoren des Urogenitalsystems Oncologia (Basel) 19 , 254 (1965)
- 54) ELHILALI, M.M., J.A. OLIVER, A.L. SHERVIN, K.J. MACINNON: Lactate dehydrogenase isoenzymes in hyperplasia and carcinoma of the prostata: A clinical study J. Urol. (Baltimore) 98 , 686 (1967)
- 55) ELLIOT, B.A., J.H. WILKINSON: Serum " α -hydroxybutyric dehydrogenase" in myocardial infarction and in liver disease Lancet I, 698 (1961)
- 56) ELLIOT, B.A., J.H. WILKINSON: The serum α -hydroxybutyric dehydrogenase in diseases other than myocardial infarction Clin. Sci. 24 , 343 (1963)
- 57) ERICKSON, R.J., D.R., MORALES: Clinical use of lactic dehydrogenase New Engl. J. Med. 265 , 478 (1961)
- 58) FEGELER, K., W. FEGELER, U. GERLACH: Experimentelle Untersuchungen über die Altersabhängigkeit von Isoenzymen der LDH Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 77 , 166 (1971)

- 59) FERGUSON, E.E. jr.: Tetrazolium staining lactate dehydrogenase isoenzymes: Reduction of tetrazolium salts in the absence of added L-lactic acid
Enzymologia 40 , 81 (1971)
- 60) FINE, I.H., L.A. COSTELLO: The use of starch electrophoresis in dehydrogenase studies
Meth. Enzymol 6 , 958 (1963)
- 61) FINE, I.H., N.O. KAPLAN, D. KUFTINEL: Developmental changes of mammalian lactic dehydrogenases
Biochemistry 2 , 116 (1963)
- 62) FRITZ, P.J., K.B. JACOBSON: Lactic dehydrogenases: Subfractionation of isozymes
Science 140 , 64 (1963)
- 63) FRÖHLICH, C.: Über die Analyse erhöhter Serumaktivitäten der LDH bei neoplastischen Erkrankungen mit Hilfe der Isoenzymauftrennung
Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 73 , 844 (1967)
- 64) FRÖHLICH, C., E. KURRLE: Untersuchungen zur Zusammensetzung des Verteilungsmusters der LDH-Isoenzyme im Serum von Patienten mit akuter Paraleukoblastose
Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 74 , 166 (1968)
- 65) FUJIMOTO, Y., I. NAZARIAN, J.H. WILKINSON: Lactate dehydrogenase isoenzyme polymorphism in a patient with secondary carcinoma of the liver
Enzymologia biol. clin. 9 , 124 (1968)
- 66) GERHARDT, W., J. CLAUSEN, E. CHRISTENSEN, J. RIISHEDE: Changes of LDH-isozymes, esterases, acid phosphatases and proteins in malignant and benign human brain tumours
Acta neurol. scand. 39 , 85 (1963)

- 67) GEYER, E., S. MARGHESCU, J.J. MÜLLER: Polyacrylamid-Disc-Elektrophorese: Versuche zur Isolierung und Charakterisierung von Human-Serumproteinen
Klin. Wschr. 45 , 717 (1967)
- 68) GEYER, H.: LDH-Isoenzyme in Tumoren des menschlichen Uterus
Klin. Wschr. 46 , 389 (1968)
- 69) GOLDBERG, E.: Lactic and malic dehydrogenases in human spermatozoa
Science 139 , 602 (1963)
- 70) GOLDMAN, R.D., N.O. KAPLAN: Alterations of tissue lactate dehydrogenase in human neoplasms
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 77 , 515 (1963)
- 71) GOLDMAN, R.D., N.O. KAPLAN, T.C. HALL: Lactate dehydrogenase in human neoplastic tissue
Cancer Res. 24 , 389 (1964)
- 72) GOODFRIEND, T.L., N.O. KAPLAN: Induction of changes in the subunit composition of lactic dehydrogenase
J. cell. Biol. 19 , 28 A (1963)
- 73) GOODFRIEND, T.L., N.O. KAPLAN: Effects on hormone administration on lactic dehydrogenase
J. biol. Chem. 239 , 130 (1964)
- 74) GOODFRIEND, T.L., N.O. KAPLAN: Regulation of isoenzyme patterns in tissue culture
Clin. Res. 13 , 323 (1965)
- 75) HAKALA, M.T., A.J. GLAID, G.W. SCHWERT: Kinetics and specificity of lactic dehydrogenase
Fed. Proc. 12 , 213 (1953)
- 76) HELLER, W., P. OLDENKOTT, W. DREISEN, W. ELIES, H. BLANKENHORN: Klinisch-chemische Untersuchungen zur

Früherfassung von bösartigen Hirntumoren

Ärztl. Forsch. 2 , 44 (1971)

- 77) HESS, B.: DPN-dependent enzymes in serum
Ann. N.Y. Acad. Sci. 75 , 292 (1958)
- 78) HESS, B., S.I. WALTER: Über das Protein der Laktatdehydrogenase im menschlichen Serum und Gewebe
Klin. Wschr. 38 , 1080 (1960)
- 79) HESS, B., S.I. WALTER Chromatographic differentiation of lactate dehydrogenase of human tissue and serum
Ann. N.Y. Acad. Sci. 94 , 890 (1961)
- 80) HILL, B.R.: Serum lactic dehydrogenase in Cancer Patients
J. nat. Cancer Inst. 18 , 307 (1957)
- 81) HILL, B.R.: Electrophoretic fractionation of serum lactic dehydrogenase
Cancer Res. 21 , 271 (1961)
- 82) HILL, B.R., E.J. MEACHAM: Separation and characterisation of lactic dehydrogenases from serum and formed elements of human blood
Ann. N.Y. Acad. Sci. 94 , 868 (1961)
- 83) HJERTEN, S.: "Molecular sieve" chromatography on polyacrylamide gels prepared according to a simplified method.
Arch. Biochem. Suppl 1 , 147 (1962)
- 84) HOCH-LIGETTI, C., T.J. BROWN, J. M. ARVIN: Effect of malignant growth on the organ lactate dehydrogenase in the human
Cancer (Philad.) 18 , 1089 (1965)
- 85) HOFFMEISTER, H., K.H. SCHÜTT: Diagnostische Verwendbarkeit der Polyacrylamid-Elektrophorese
Dtsch. med. Wschr. 97 , 1464 (1972)

- 86) HSIEH, K.M., V. SUNTZEFF, E.V. COWDRY: Serum lactic dehydrogenase activity as indication of neoplastic growth and regression
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y. 89 , 627 (1955)
- 87) HSIEH, K.M., H.T. BLUMENTHAL: Serum lactic dehydrogenase levels in various disease states
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 91 , 626 (1956)
- 88) HSIEH, K.M., V. SUNTZEFF, E.V. COWDRY: Comparative study of serum lactic dehydrogenase activity in mice with transplanted and induced tumours
Cancer Res. 16 , 257 (1956)
- 89) HULE, V.: Isoenzymes of lactic dehydrogenase in human platelets
Clin. chim. Acta 13 , 431 (1966)
- 90) HULE, V.: The activity of LDH isoenzymes: no correlation to metabolism?
Clin. chim. Acta 31 , 298 (1971)
- 91) HUNTER, R.L., M.S. BURSTONE: The zymogram as a tool for characterizing enzyme substrate specificity
J. Histochem. Cytochem. 6 , 396 (1958)
- 92) JOHNSON, H.L., R.F. KAMPFSCHMIDT: Lactic dehydrogenase isoenzymes in rat tissues, tumours and precancerous livers
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 120 , 557 (1965)
- 93) JONGKIND, J.F., J.H. WISSE, H. BLOEMENDAL, W.S. BONT: Purity of alpha-crystallin
Nature (London) 193 , 437 (1962)
- 94) KAPLAN, N.O., M.M. CIOTTI: Evolution and differentiation of dehydrogenases
Ann. N.Y. Acad. Sci. 94 , 701 (1961)

- 95) KAPLAN, N.O., S. WHITE: Immunological characteristics of dehydrogenases
Ann. N.Y. Acad. Sci. 103 , 835 (1963)
- 96) KAPLAN, N.O.: Lactate dehydrogenase - structure and function
Symp. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 17 , 131 (1964)
- 97) KATZ, A.M., W. KALOW: Electrophoretic characterisation of human dehydrogenases
Canad. J. Biochem. 43 , 1653 (1965)
- 98) KINGSLEY, D.P.E., J. COOK, A.E. VARTAN: The effect of hemolysis on some plasma and serum enzymes in man
Clin. chim. Acta 12 , 489 (1965)
- 99) KLUGE, A., H. HAUG: Durch Thrombozyten bedingte Enzymaktivitätserhöhung der LDH, MDH und ALD in menschlichem Serum
Med. Welt 21 , 1981 (1970)
- 100) KNUDSEN, F.U., J. GORMSEN: Lactate dehydrogenase isoenzymes in thrombocytes in various diseases
Scand. J. Haemat. 5 , 361 (1968)
- 101) KOHLRAUSCH, F.: Über Konzentrationsverschiebungen durch Elektrolyte im Inneren von Lösungen und Lösungsgemischen
Ann. Physik 62 , 209 (1897)
- 102) KOWALEWSKI, S.L.: Die Isoenzyme der Laktatdehydrogenase
Thieme, Stuttgart 1972
- 103) KREBS, A., K. SELLEI, H. SCHALTEGGER: Disc-elektrophoretische Untersuchungen der wasserlöslichen und "strukturellen" Proteine in normaler und psoriatischer Epidermis
Dermatologica (Basel) 138 , 129 (1968)
- 104) KREBS, H.A.: The control of enzyme patterns in animal tissues
Biochem. J. 98 , 37 (1966)

- 105) KRIEG, A.F., S. GORTON, J.B. HENRY: Effect of temperature on activity and lactate optima of LDH isoenzymes
Clin. chim. Acta 17 , 363 (1967)
- 106) KÜSTNER, W., D. PRASSE, J. WEINREICH: LDH-Isoenzymbestimmungen bei inneren Krankheiten
Med. Klin. 63, 605 (1968)
- 107) KÜSTNER, W., J. WEINREICH: Vergleichende Untersuchungen von LDH-Isoenzymmustern in Seren, Tumoren und Metastasen Tumorkranker
Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 75 , 529 (1969)
- 108) KÜSTNER, W., J. WEINREICH: Agargel-elektrophoretischer Nachweis von LDH-Isoenzymen bei Tumorkrankern
Klin. Wschr. 48 , 560 (1970)
- 109) LANGVAD, E.: Lactate dehydrogenase isoenzyme patterns in the tumour-bearing colon
Int. J. Cancer 3 , 17 (1968)
- 110) LANGVAD, E.: Lactate dehydrogenase isoenzyme pattern in bronchogenic carcinoma
(Europ. J. Cancer 4 , 107 (1968)
- 111) LANGVAD, E.: Reversible and irreversible LDH isoenzymatic alterations in malignant and non-malignant murine tissues during cultivation: A correlation between tumour morphology and isoenzyme structure
Acta path. microbiol. scand. 76 , 432 (1969)
- 112) LANGVAD, E., B. ROED-PETERSEN: Lactate dehydrogenase isoenzyme patterns in orale leukoplakias and clinically uninvolved oral mucosa of the same persons
Acta path. microbiol. scand. 78 , 505 (1970)
- 113) LANGVAD, E., J. ZACHARIAH, J.J. PINDBORG: Lactate dehydrogenase isoenzyme patterns in leukoplakia, submucous

fibrosis and carcinoma of the oral mucosa in South Indians
Acta path. microbiol. scand. 78 , 509 (1970)

- 114) LARSON, L., L. COHEN: The origin of serum lactic dehydrogenase
Clin. Res. 14 , 320 (1969)
- 115) LATNER, A.L.: The dehydrogenase Isoenzymes
Proc. Ass. clin. Biochem. 3 , 120 (1964)
- 116) LATNER, A.L., D.M. TURNER, S.A. WAY: Enzyme and isoenzyme studies in preinvasive carcinoma of the cervix
Lancet II, 814 (1966)
- 11) LATNER, A.L., A.W. SKILLEN: Isoenzymes in biology and medicine
Academic Press, New York, p. 165 (1968)
- 118) LAWRENCE, S.H.: The zymogram in clinical medicine
Thomas, Springfield / Ill. 1964
- 119) LEHMANN, F.G., K.W. SCHNEIDER, G. SCHERING, U. KOCH: Enzymelektrophorese bei internen Erkrankungen.
Methodische und klinische Untersuchungen zur differentialdiagnostischen Bedeutung der elektrophoretischen Auftrennung der LDH in Isoenzyme
Vitamine, Hormone, Fermente XIV, 301 (1967)
- 120) LÜHRS, W., E. NAGELIN: Über das Vorkommen von Milchsäuredehydrogenasen im Serum krebskranker Patienten
Klin. Wschr. 34 , 148 (1958)
- 121) MARGHESCU, S., O. BRAUN-FALCO: Immunologischer Nachweis von Serumproteinen in Psoriasis-Schuppen-Extrakten
Arch. Klin. exp. Derm. 223 , 157 (1965)

- 122) MARGHESCU, S.: Über das Lactatdehydrogenase-Zymogramm in Hornschicht, Epidermis und Blutserum unter normalen Bedingungen und bei Psoriasis
Arch. Klin. exp. Derm. 225 , 163 (1966)
- 123) MARGHESCU, S.: Über wasserlösliche Proteine in normaler und psoriatischer Hornschicht. I. Das PAA-Gel-elektrophoretische Proteinspektrum
Arch. Klin. exp. Derm. 228 , 327 (1967)
- 124) MARKERT, C.L., F. MÖLLER: Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic and species specific patterns
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 45 , 753 (1959)
- 125) MARKERT, C.L., E. APPELLA: Physicochemical nature of isozymes
Ann. N.Y. Acad. Sci. 94 , 678 (1961)
- 126) MARKERT, C.L., H. URSPRUNG: The ontogeny of isozyme patterns of lactate dehydrogenase in the mouse
Develop. Biol. 5 , 363 (1962)
- 127) MARKERT, C.L.: Cytodifferential and macromolecular synthesis. In: 21th Symposium of the Society for Study Development and Growth
Academic Press, New York, p. 65 (1963)
- 128) MARKERT, C.L.: Lactate dehydrogenase isoenzymes: Dissociation and recombination of subunits
Science 140 , 1329 (1963)
- 129) MARKERT, C.L., E. APPELLA: Immunochemical properties of lactate dehydrogenase isozymes
Ann. N.Y. Acad. Sci. 103 , 915 (1963)

- 130) MARKERT, C.L.: The molecular basis for enzymes
Ann. N.Y. Acad. Sci. 151 , 14 (1968)
- 131) MASTERS, C.J., M. HINKS: The regulation of lactate dehydroge-
nase biosynthesis during morphogenesis
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 89 , 161 (1966)
- 132) MAURER, R.H.: Disk-Elektrophorese
de Gruyter, Berlin 1967
- 133) McBeth, R.A.L., J.G. BEKESI: Oxygen consumption and
anaerobic glycolysis of human malignant and normal tissue
Cancer Res. 22 , 244 (1962)
- 134) MEISTER, A.: Reduction of diketo- and keto acids catalyzed
by muscle preparations and by cristalline lactic dehydrogenase
J. biol. Chem. 184 , 117 (1950)
- 135) MERTEN, R., H.G. SOLBACH: Enzymverteilungsmuster des
glykolytischen Systems und Citronensäurecyclus im Plasma
Krebskranker
Klin. Wschr. 39, 222 (1961)
- 136) MILLAR, D.B.S.: Physicochemical properties of lactic
dehydrogenase
J. biol. Chem. 237 , 2135 (1962)
- 137) MOORE, B.W., P.V. ANGELETTI: Chromatographic hetero-
geneity of some enzymes in normal tissues and tumours
Ann. N.Y. Acad. Sci. 94 , 659 (1961)
- 138) MORGANS, H.G.: Changes in enzyme patterns in pathological
tissues
Biochem. J. 98 , 37 (1966)

- 139) NACHLAS, M.M., S.I. MARGULIES, J.B. GOLDBERG, A.M. SELIGMAN: The determination of lactic dehydrogenase with a tetrazolium salt
Analyt. Biochem. 1 , 317 (1960)
- 140) NEILANDS, J.B.: Studies on lactic dehydrogenase of heart. I. Purity, kinetics and equilibria
J. biol. Chem. 199 , 373 (1952)
- 141) NISSELBAUM, J.S., O. BODANSKY: Reactions of lactic dehydrogenase from various rabbit organs with antirabbit muscle lactic dehydrogenase
J. biol. Chem. 234 , 3276 (1959)
- 142) NISSELBAUM, J.S. O. BODANSKY: Reactions of human tissue lactic dehydrogenase with antisera to human heart and liver lactic dehydrogenase
J. biol. Chem. 236 , 401 (1961)
- 143) NISSELBAUM, J.S., O. BODANSKY: Immunochemical studies of human lactic dehydrogenases
Ann. N.Y. Acad. Sci. 103 , 930 (1963)
- 144) NISSEN, N.I., L. BOHN: Pattern of lactic acid dehydrogenase isoenzymes in normal and malignant human tissues
Europ. J. Cancer 1 , 217 (1965)
- 145) NITOWSKI, H.M.: Isoenzymes: A new chapter in molecular diversity
Pediatrics 37 , 3 (1966)
- 146) OKABE, K., T. HAYAKAMA, M. HAMADA, M. KOIKE: Purification and comparative properties of human LDH isoenzymes from uterus, uterine myoma and cervical cancer
Biochemistry 6 , 79 (1968)

- 147) ONO, T., S. WEINHOUSE: Isozymes and enzyme regulation in cancer
University Park Press, Baltimore 1973
- 148) ORNSTEIN, L., B.J. DAVIS: Disc elektrophoresis Distillation Products Industries (Division of Eastman Kodak Co.), Rochester, New York 1959
- 149) ORNSTEIN, L., B.J. DAVIS: Disc electrophoresis. Distillation Products Industries (Division of Eastman Kodak Co.), (Division of Eastman Kodak Co.), Rochester, New York 1962
- 150) ORNSTEIN, L.: Disc electrophoresis. I. Background and theory Ann. N.Y. Acad. Sci. 121 , 321 (1964)
- 151) OSTER, G.K., G. OSTER, G. PRATI: Dye-sensitized photopolymerisation of acrylamide
J. Amer. chem. Soc. 79 , 595 (1957)
- 152) PEARSE, A.G.E.: Application of the alkaline tetrazolium reaction of the study of reducing groups in tissue sections
J. Path. Bact. 67 , 129 (1954)
- 153) PEARSE, A.G.E.: Histochemistry-theoretical and applied 2nd ed. , Churchill, London 1960
- 154) PFLEIDERER, G., D. JECKEL: Individuelle Milchsäuredehydrogenase bei verschiedenen Säugetieren
Biochem. Z. 329 , 370 (1957)
- 155) PFLEIDERER, G., E.D. WACHSMUTH: Alters- und funktionsabhängige Differenzierung der Lactatdehydrogenase menschlicher Organe
Biochem. Z. 334 , 185 (1961)

- 156) PFLEIDERER, G. E.D. WACHSMUTH: Die Heterogenität der Lactatdehydrogenase in Entwicklungsgeschichte und Pathologie des Menschen.
Klin. Wschr. 39 , 352 (1961)
- 157) PHILIPP, J., E.S. VESELL: Sequential alterations of lactic dehydrogenase isozymes during embryonic development and in tissue culture
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 110 , 582 (1962)
- 158) PLAGEMANN, P.G.W., K.F. GREGORY, F. WROBLEWSKI:
The electrophoretically distinct forms of mammalian lactic dehydrogenase. I. Distribution of lactic dehydrogenase in rabbit and human tissue
J. biol. Chem. 235 , 2282 (1960)
- 159) PLAGEMANN, P.G.W., K.F. GREGORY, F. WROBLEWSKI:
The electrophoretically distinct forms of mammalian lactic dehydrogenase. II. Properties and interrelationship of rabbit and human lactic dehydrogenase
J. biol. Chem. 235 , 2288 (1960)
- 160) PLAGEMANN, P.G.W., K.F. GREGORY, F. WROBLEWSKI:
Die elektrophoretisch trennbaren Lactatdehydrogenasen des Säugers. III. Einfluß der Temperatur auf die Lactatdehydrogenasen des Kaninchens.
Biochem. Z. 334 , 37 (1961)
- 161) PLUMMER, D.T., B.A. ELLIOTT, K.B. COOKE, J.H. WILKINSON: Organ specificity and lactate dehydrogenase activity.
1. The relative activation with pyruvate and 2-oxobutyrate of electrophoretically separated fractions
Biochem. J. 87 , 416 (1963)

- 162) PLUMMER, D.T., J.H. WILKINSON: Organ specificity and lactate dehydrogenase activity. 2. Some properties of human heart and liver preparations
Biochem. J. 87, 423 (1963)
- 163) POULIK, M.D.: Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers
Nature (London) 180 1477 (1957)
- 164) POZNANSKA-LINDE, H., J.H. WILKINSON, W.A. WITHYCOMBE: Lactate dehydrogenase isoenzymes in malignant tissues
Nature (London) 209 , 727 (1966)
- 165) RABINOWITZ, Y., A. DIETZ: Malic and lactic dehydrogenase isozymes of normal and leukemic leukocytes separated on glass bead columns
Blood 29 , 182 (1967)
- 166) RAYMOND, S., L.S. WEINTRAUB: Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis
Science 130 , 711 (1959)
- 167) RAYMOND, S., Y.J. WANG: Preparation and properties of acrylamide gel for use in electrophoresis
Analyt. Biochem. 1 , 391 (1960)
- 168) RAYMOND, S., B. AURELL: Two-dimensional gel electrophoresis
Science 138 , 153 (1962)
- 169) RAYMOND, S., M. NAKAMICHI: Electrophoresis in synthetic gels: Relation of gel structure to resolution
Analyt. Biochem. 3 , 23 (1962)
- 170) RAYMOND, S., M. NAKAMICHI, B. AURELL: Acrylamide gel as an electrophoresis medium
Nature (London) 195 , 697 (1962)

- 171) RAYMOND, S. : Acrylamide gel electrophoresis
Ann. N.Y. Acad. Sci. 121 , 350 (1964)
- 172) REISFELD, R.A., V.J. LEWIS, D.E. WILLIAMS: Disc-electrophoresis of basis proteins and peptides on polyacrylamide gels
Nature (London) 195 , 281 (1962)
- 173) RESSLER, N.J., L. SCHULZ, R.R. JOSEPH: Concept of multiple molecular forms of lactic dehydrogenases
Nature (London) 197 , 872 (1962)
- 174) RESSLER, N.J., L. SCHULZ, R.R. JOSEPH: Validity of electrophoretic determination of lactic dehydrogenase isoenzymes
Nature (London) 198 , 888 (1963)
- 175) RESSLER, N.J., L. SCHULZ, R.R. JOSEPH: Factors influencing the electrophoretic migration of lactic dehydrogenase
J. Lab. clin. Med. 69 , 571 (1963)
- 176) RICHTERICH, R.: Enzymopathologie
Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1958
- 177) RICHTERICH, R., E. GAUTIER, E. EGLI, K. ZUPPINGER, E. ROSSI: Progressive Muskeldystrophie. I. Die Heterogenität der Serum-Lactat-Dehydrogenase
Klin. Wschr. 39 , 346 (1961)
- 178) RICHTERICH, R., K. ZUPPINGER, E. ROSSI: Diagnostic significance of heterogeneous lactic dehydrogenases in malignant effusions
Nature (London) 191 , 507 (1961)
- 179) RICHTERICH, R., A. BURGER, H. WEBER: Die Inaktivierung der Lactatdehydrogenase durch Harnstoff. I. Selektive Hemmung der elektrophoretisch langsam wandernden Isoenzyme
Helv. physiol. pharmacol. Acta 20 , C 78 (1962)

- 180) RICHTERICH, R., J. LOCHER, K. ZUPPINGER, E. ROSSI:
Die Differentialdiagnose maligner und benigner Ergüsse durch
Bestimmung der Lactatdehydrogenase-Isoenzyme
Schweiz. med. Wschr. 92, 919 (1962)
- 181) RICHTERICH, R., A. BURGER: Lactate dehydrogenase isoenzymes
in human cancer cells and malignant effusions
Enzymol. biol. clin. 3, 65 (1963)
- 182) RICHTERICH, R., P. SCHAFFROTH, H. AEBI: A study of
lactic dehydrogenase isoenzyme patterns of human tissues by
adsorption-elution on sephadex - DEAE
Clin.- chim. Acta 8, 178 (1963)
- 183) RICHTERICH, R.: Die diagnostische Bedeutung der Plasmaenzyme
Ciba-Symposium 12, 114 (1964)
- 184) ROMAN, W.: Quantitative estimation of lactate dehydrogenase
isoenzymes in serum. I. Review of methods and distribution in
human tissues
Enzymologia 36, 189 (1969)
- 185) ROSALKI, S.B., J.H. WILKINSON: Reduction of α -Ketobutyrate
by human serum
Nature (London) 188, 1110 (1960)
- 186) ROSALKI, S.B., J.H. WILKINSON: Serum α -hydroxybutyrate
dehydrogenase in diagnosis
J. Amer. med. Ass. 189, 161 (1964)
- 187) ROSSMANN, M.G. et al: Mitteilung in:
Med. Tribune 5 / 43 (1970)
- 188) SAKATI, I.A., P.C. DEVINE, C.J. DEVINE, J.G. FIVEASH,
E.F. PUTASSE: Serum lactate dehydrogenase in acute renal
infarction and ischemia
New Engl. J. Med. 278, 721 (1968)

- 189) SAYRE, F.W., B.R. HILL: Fractionation of serum lactic dehydrogenase by salt concentration gradient elution and paper electrophoresis
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 96 , 695 (1957)
- 190) SCHNEIDER, K.W. F.O. LEHMANN, G. SCHERING: Die enzymatische Diagnostik des Herzinfarktes: LDH-Isoenzyme beim Herzinfarkt
Enzymol. biol. clin. 6 , 52 (1966)
- 191) SCHRAUWEIN, J.A.M.: Nachweis von Enzymen nach elektrophoretischer Trennung an PAA-Säulen
J. Chromatog. 23 , 177 (1966)
- 192) SCHWENKE, K.D.: Vergleichende Untersuchungen löslicher Organproteine aus Tumor- und Normalgeweben mit Hilfe der freien Elektrophorese
Z. Krebsforsch. 68 , 112 (1966)
- 193) SCHWENKE, K.D., R. PLASS, M. KUJAWA: Fraktionierung löslicher Organproteine aus Tumor- und Normalgeweben des Goldhamsters mit Hilfe der Stärkegel-Elektrophorese und Ultrazentrifugation
Z. Krebsforsch. 68 , 234 (1966)
- 194) SCHWENKE, K.D., R. PLASS: Vergleichende elektrophoretische Untersuchungen von Isoenzymmustern in Extrakten aus Tumor- und Normalgewebe sowie im Serum des Goldhamsters
Arch. Geschwulstforsch. 28 , 328 (1967)
- 195) SHAW, C.R., E. BARTO: Genetic evidence for the subunit structure of lactate dehydrogenase isozymes
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 50 , 221 (1963)
- 196) SMITHIES, O.: Zone electrophoresis in starch gel: Group variations in the serum proteins of normal human adults
Biochem. J. 61 , 629 (1955)

- 197) SPECTOR, I. , W. McFARLAND, N.P. TRUJILLO, H.E.
TICKTIN: Bone marrow lactic dehydrogenase in hematologic and
neoplastic diseases
Enzymol. biol. clin. 7 , 78 (1966)
- 198) STAGG, B.H., G.A. WHYLEY: Some characteristics of lactate
dehydrogenase isoenzymes in tumours of the female genital tract
Clin. chim. Acta 22 , 521 (1968)
- 199) STAMBAUGH, R., A. GOLDSTEIN, M. KOPPEL, D. POST:
Lactic dehydrogenase subunit content of some human tumours
and the serum and urine of cancer patients
Proc. Amer. Ass. Cancer Res. 7 , 67 (1966)
- 200) STANISLAWSKI-BIRENCWAJG, M., F. LOITILLIER: Distri-
bution of LDH isoenzymes in mastitis, fibroadenoma and
carcinomas of the human mammary gland
Europ. J. Cancer 1 , 221 (1965)
- 201) STARKWEATHER, W.H., H.K. SCHOCH: Some observations of
the lactic dehydrogenase of human neoplastic tissue
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 62 , 440 (1962)
- 202) STARKWEATHER, W.H., H.H. SPENCER, E.L. SCHWARZ,
H.K. SCHOCH: The electrophoretic separation of lactate
dehydrogenase isozymes and their evaluation in clinical medicine
J. Lab. clin. Med. 67 , 329 (1966)
- 203) STAVROU, D.: Beitrag zur Morphologie und Enzymhistochemie
experimenteller Tumoren des ZNS der Ratte. II. Enzymhistochem.
Befunde
Acta neuropath. 15 , 231 (1970)
- 204) STRAUB, F.B.: Crystalline lactic dehydrogenase from heart
muscle
Biochem. J. 34 , 483 (1940)

- 205) : STUHLFELDER, M: Fraktionierung und immunologische Identifizierung der wasserlöslichen Epidermisproteine
Dissertation, München 1969
- 206) : STÜTTGEN, G.: Zur Atmung und Glykolyse der normalen und krankhaft veränderten Haut
Arch. Klin. exp. Derm. 201 , 507 (1955)
- 207) : VESELL, E.S., A.G. BEARN: Localisation of lactic dehydrogenase activity in serum fractions
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 94 , 96 (1957)
- 208) : VESELL, E.S., A.G. BEARN: The heterogeneity of lactic and malic dehydrogenase
Ann. N.Y. Acad. Sci. 75 , 286 (1958)
- 209) : VESELL, E.S.: Significance of the heterogeneity of lactic dehydrogenase activity in human tissues
Ann. N.Y. Acad. Sci. 94 , 877 (1961)
- 210) : VESELL, E.S., A.G. BEARN: Isoenzymes of lactic dehydrogenase in human tissues
J. clin. Invest. 40 , 586 (1961)
- 211) : VESELL, E.S., J. PHILIPP, A.G. BEARN: Comparative studies of the isozymes of the lactic dehydrogenase in rabbit and man. Observations during development and in tissue culture
J. exp. Med. 116 , 797 (1962)
- 212) : VESELL, E.S.: Polymorphism of human lactate dehydrogenase isozymes
Science 148 , 1103 (1965)
- 213) : VESELL, E.S., P. FRITZ, E.L. WHITE: Effects of buffer, pH, ionic strength and temperature on lactate dehydrogenase isoenzymes
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 159 , 236 (1968)

- 214) WACHSMUTH, E.D., G. PFLEIDERER: Biochemische Untersuchungen an kristallinen Isozymen der Lactatdehydrogenase aus menschlichen Organen
Biochem. Z. 336 , 545 (1963)
- 215) WACHSMUTH, E.D.: Effect of amitosis on the distribution of human lactic acid dehydrogenase isozymes
Nature (London) 204 , 681 (1964)
- 216) WACHSMUTH, E.D., G. PFLEIDERER, T. WIELAND: Aminosäurezusammensetzung von Isozymen der Lactatdehydrogenase aus menschlichen und tierischen Organen
Biochem. Z. 340 , 80 (1964)
- 217) WARBURG, O., F. WIND, E. NEJELEIN: Über den Stoffwechsel von Tumoren im Körper
Klin. Wschr. 5 , 829 (1926)
- 218) WEBER, G., I. WILDNER: Über die Milchsäuredehydrogenase-Aktivität im Blut und der Hautblasenflüssigkeit bei Dermatosen
Derm. Wschr. 138 , 767 (1958)
- 219) WEBER, G.: Über enzymatische Mechanismen in menschlicher Epidermis
Münch. med. Wschr. 101 , 1872 (1959)
- 220) WEBER, G.: Vergleichende fermentchemische Untersuchungen im Blut, Hautblasenserum, Epidermishomogenat und in Psoriasiserschuppen
Arch. Klin. exp. Derm. 211 , 183 (1960)
- 221) WEBER, G., G. PFLEIDERER: Isoenzymes in the human epidermis
Ann. N.Y. Acad. Sci. 94 , 933 (1961)

- 222) WIDY-KIERSKA, K., J. ROSZKOWSKI: LDH-activity in patients with ovarian tumours
Obstet. and Gynec. 31 , 243 (1968)
- 223) WIELAND, T., G. PFLEIDERER: Nachweis der Heterogenität von Milchsäuredehydrogenasen verschiedenen Ursprungs durch Trägerelektrophorese
Biochem. Z. 329 , 104 (1957)
- 225) WIELAND, T., G. PFLEIDERER, I. HAUPT, W. WÖRNER: Über die Verschiedenheit der Milchsäuredehydrogenasen. IV! Quantitative Ermittlung einiger Enzymverteilungsmuster. Vergleichende Betrachtung bei verschiedenen Wirbeltierklassen
Biochem. Z. 332 , 1 (1959)
- 226) WIELAND, T., G. PFLEIDERER, F. ORTANDERL: Über die Verschiedenheit der Milchsäuredehydrogenasen. III. Vergleiche der Milchsäuredehydrogenasen aus verschiedenen Rattenorganen.
Biochem. Z. 331 , 103 (1959)
- 227) WIELAND, T., G. PFLEIDERER, K. RAJEWSKY: Über die Verschiedenheit der Milchsäuredehydrogenasen. V. Papierelektrophoretischer Vergleich der tryptischen Spaltprodukte
Z. Naturforsch. 15 b , 434 (1960)
- 228) WIELAND, T., G. PFLEIDERER: Heterogeneity of lactic dehydrogenases. VI. Chemical differences between multiple forms of lactic acid dehydrogenases
Ann. N.Y. Acad. Sci. 94 , 691 (1961)
- 229) WIELAND, T., G. PFLEIDERER: Multiple Formen von Enzymen
Advanc. Enzymol. 25 , 329 (1963)
- 230) WIEME, R.J. : Studies on agar gel electrophoresis
Arscia Uitgaven N.V., Brüssel 1959

- 231) WIEME, R.J.: Multiple molecular forms of enzymes and their use in clinical diagnosis
Nature (London) 199 , 437 (1963)
- 232) WIEME, R.J., W.Z. VAN HOVE, M.E. VAN DER STRAETEN:
The influence of cytostatic treatment on serum LDH patterns of patients with bronchial carcinoma and its relation to tumor regression
Ann. N.Y. Acad. Sci. 151 , 213 (1968)
- 233) WIGGERT, B., C.A. VILLEE: Multiple molecular forms of malic and lactic dehydrogenase during development
J. biol. Chem. 239 , 444 (1964)
- 234) WILKINSON, J.H.: Isoenzymes
Spon's Biochemical Monographs, Spon, London 1965
- 235) WILKINSON, J.H.: Clinical applications of isoenzymes
Clin. Chem. 16 , 733 (1970)
- 236) WILLIAMS, D.E., R.A. REISFELD: Disc electrophoresis in polyacrylamide gels: Extension to new conditions of pH and buffer.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 121 , 373 (1964)
- 237) WITHYCOMBE, W.A.: (zitiert nach WILKINSON, J.H.: Isoenzymes. Spon, London 1965) Ph. D. Thesis, University of London 1965
- 238) WITHYCOMBE, W.A., D.T. PLUMMER, J.H. WILKINSON:
Organ specificity and lactate dehydrogenase activity
Biochem. J. 94 , 384 (1965)
- 239) WOLFF, H., J. HEBER: Enzymaktivitäten histologische differenter Magencarcinomtypen
Arch. Geschwulstforsch. 32 , 239 (1968)

- 240) WÖRNER, W.: Bedeutung und Grenzen der Lactatdehydrogenase-Isoenzyme bei inneren Erkrankungen
Med. Klin. 59 , 434 (1964)
- 241) WROBLEWSKI, F., K.F. GREGORY: Lactic dehydrogenase isoenzymes and their distribution in normal tissues and plasma and in disease states
Ann. N.Y. Acad. Sci. 94 , 912 (1961)
- 242) WÜST, H., E. ARNOLD, H. SCHÖN: Die thermische Inaktivierung von Serum und Organlactatdehydrogenasen als Methode zur Isoenzymtrennung
Klin. Wschr. 43 , 500 (1965)
- 243) ZINKHAM, W.H., A. BLANCO, L. KUPCHYK: Lactate dehydrogenase in testis: Dissociation and recombination of subunits
Science 142 , 1303 (1963)
- 244) ZINKHAM, W.H., A. BLANCO, L. KUPCHYK: Isozymes: Biological and clinical significance
Pediatrics 37, 120 (1966)
- 245) ZONDAG, H.A.: Lactate dehydrogenase isozymes: Lability at low temperature
Science 142 , 965 (1963)
- 246) ZONDAG, H.A.: Determination and diagnostic significance of lactate dehydrogenase isoenzymes
Van Gorcum's Medical Library 199, Assen 1967
- 247) ZONDAG, H.A., F. KLEIN: Clinical applications of lactate dehydrogenase isoenzymes: Alterations in malignancy
Ann. N.Y. Acad. Sci. 151 , 578 (1968)
- 248) ZUPPINGER, K., R. RICHTERICH, E. ROSSI: Die diagnostische Bedeutung der Heterogenität der Serum-Lactatdehydrogenasen
Schweiz. med. Wschr. 92 , 169 (1962)

- 249) ZWISLER, O., H. BIEL: Über die Elektrophorese in horizontalem Polyacrylamid-Gel. 3. Die Kombination von Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese und Immundiffusion
Behringwerk-Mitteilung (Marburg) 46 , 129 (1966)
- Nachtrag
- 250) BOHN, L., H.W. ROTHENBORG: Lactate dehydrogenase patterns in verrucae vulgares, basal cell carcinomas and malignant melanomas
J. invest. Derm. 48 , 221 (1967)
- 251) LEWIS, C. Jr., M. SCHMITT, F.B. HERSHEY: Heterogeneity of lactic dehydrogenase of human skin
I. invest. Derm. 48 , 221 (1967)

Lebenslauf

Jost Schuchard, geboren am 1. 4. 1944 in Spremberg als 2. Kind des Arztes Dr. Wilhelm Schuchard und seiner Frau Felicitas, geborene Scharlach.

Besuch der Emil-von-Behring-Volksschule in Marburg von 1951-1955.

Besuch des Gymnasiums Philippinum in Marburg von 1955 - 1964.

Reifeprüfung dort am 24. 2. 1964.

Medizinisches Studium an den Universitäten in Marburg (Vorphysikum und Physikum), Kiel (erstes klinisches Semester) und München.

Ärztliche Prüfung am 5. 8. 1970 an der Universität München.

Seit Winter 1967 / 68 Förderung durch die Studienstiftung des deutschen Volkes.

Famulaturen in Berlin (II. Medizin. Universitätsklinik), Boston/ Massachusetts (The Malden Hospital) und München (Dermatolog. Universitätsklinik).

Medizinalassistenzeit an der Medizin. Poliklinik München und der Chirurg. Klinik der TU München.

Approbation am 12. 4. 1972.

Seit Februar 1972 als Assistent an der Medizin. Poliklinik der Universität München tätig.

Herrn Professor Dr. S. Marghescu

danke ich für die Überlassung des Themas und für die freundliche
Unterstützung bei der Ausarbeitung dieser Dissertation.

